

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-139288

(43)Date of publication of application : 13.06.1991

(51)Int.Cl. C12P 19/18  
A23L 1/03  
A23L 2/00  
A61K 7/00  
A61K 31/71  
C07H 15/26  
C12P 19/20

(21)Application number : 01-274518

(71)Applicant : HAYASHIBARA BIOCHEM LAB INC  
YAMAMOTO ITARU

(22)Date of filing : 20.10.1989

(72)Inventor : YAMAMOTO ITARU  
MUTO TOKUO  
MIYAKE TOSHIO

(30)Priority

Priority number : 01127072 Priority date : 19.05.1989 Priority country : JP

(54) ALPHA-GLYCOSYL-L-ASCORBIC ACID, ITS PRODUCTION AND USE THEREOF

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain  $\alpha$ -glucosyl-L-ascorbic acid not showing the direct reducing properties by treating a solution containing L-ascorbic acid and  $\alpha$ -glucosyl saccharide compound with glycosyltransferase.

CONSTITUTION: A solution containing L-ascorbic acid and  $\alpha$ -glucosyl saccharide compound is treated with glycosyltransferase to form  $\alpha$ -glucosyl-L-ascorbic acid not showing the direct reducing properties. Then the enzyme is deactivated by heating the reaction solution, the solution is filtered, concentrated into a syrup state or dried to prepare the powder containing  $\alpha$ -glucosyl-L-ascorbic acid. Cyclomaltodextrin glucanotransferase (EC2.4.1.19),  $\alpha$ -glucosidase (EC3.2.1.20), etc., are preferable as the glycosyltransferase.

## ⑫ 公開特許公報(A)

平3-139288

⑮ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成3年(1991)6月13日

C 12 P 19/18  
A 23 L 1/03  
A 61 K 2/00  
7/00  
31/71  
C 07 H 15/26  
C 12 P 19/20

ADK

F  
D  
X

8214-4B  
6977-4B  
6977-4B  
9051-4C  
9051-4C  
7431-4C  
7822-4C  
8214-4B

審査請求 未請求 請求項の数 12 (全16頁)

⑭ 発明の名称  $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸とその製造方法並びに用途

⑰ 特 願 平1-274518

⑱ 出 願 平1(1989)10月20日

優先権主張 ⑳ 平1(1989)5月19日㉑ 日本(JP)㉒ 特願 平1-127072

⑳ 発 明 者 山 本 格 岡山県岡山市花尻ききょう町1番地の102  
㉑ 発 明 者 武 藤 徳 男 岡山県岡山市津島中1丁目3番RB-402号  
㉒ 発 明 者 三 宅 俊 雄 岡山県岡山市奥田1丁目7番10-403号  
㉓ 出 願 人 株式会社林原生物化学 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号  
研究所  
㉔ 出 願 人 山 本 格 岡山県岡山市花尻ききょう町1番地の102

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

$\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸とその製造方法並びに用途

## 2. 特許請求の範囲

- (1) 直接還元性を示さない $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸。
- (2) L-アスコルビン酸と $\alpha$ -グルコシル糖化合物とを含有する溶液に糖転移酵素を作用させ、直接還元性を示さない $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸を生成せしめ、これを採取することを特徴とする直接還元性を示さない $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸の製造方法。
- (3) 糖転移酵素がシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ(EC 2.4.1.19)または $\alpha$ -グルコシダーゼ(EC 3.2.1.20)であることを特徴とする特許請求の範囲第(2)項記載の直接還元性を示さない $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸の製造方法。
- (4) 直接還元性を示さない $\alpha$ -グリコシル-L-ア

スコルビン酸を含有せしめた飲食物。

- (5) 直接還元性を示さない $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸を有効成分として含有せしめた抗感受性疾患剤。
- (6) 直接還元性を示さない $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸を有効成分として含有せしめた化粧品。
- (7) 2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸。
- (8) L-アスコルビン酸と $\alpha$ -グルコシル糖化合物とを含有する溶液に糖転移酵素または糖転移酵素とグルコアミラーゼ(EC 3.2.1.3)とを作用させ、2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸を生成せしめ、これを採取することを特徴とする2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸の製造方法。
- (9) 糖転移酵素がシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ(EC 2.4.1.19)または $\alpha$ -グルコシダーゼ(EC 3.2.1.20)であることを特徴とする特許請求の範囲第(8)項記載の2-

0- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸の製造方法。

(10) 2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸を含有せしめた飲食物。

(11) 2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸を有効成分として含有せしめた抗感受性疾患剤。

(12) 2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸を有効成分として含有せしめた化粧品。

### 3. 発明の詳細な説明

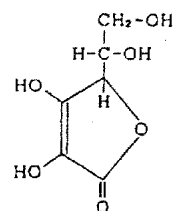
#### [産業上の利用分野]

本発明は、直接還元性を示さない $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸とその製造方法並びに用途に関し、更に詳細には、新規物質である直接還元性を示さない $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸とその生化学的製造方法並びに $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸を含有せしめた飲料、加工食品、嗜好物などの飲食物、感受性疾患の予防剤、治療剤すなわち抗感受性疾患剤および美肌剤、色白剤

などの化粧品に関する。

#### [従来の技術]

L-アスコルビン酸は、式[1]：



で示される化学構造を有しており、ヒト、サル、モルモットにとっては、生体内で合成できず、必須栄養素ビタミンCとなっている。

L-アスコルビン酸は、生体内で、例えば、生体結合組織の主成分であるコラーゲンの合成に必要なプロリンやリジンのヒドロキシル化反応に関与し、また、例えば、チトクロームCの $Fe^{+++}$ を還元して $Fe^{++}$ にするなどの酸化還元反応に関与し、更

には、白血球増加による免疫増強作用に関与するなどが知られており、生体の健康維持、増進に重要な役割をなしている。壊血病は、L-アスコルビン酸の欠乏症として古くから知られ、皮膚の虚弱化、点状出血、斑状出血、歯肉や骨髄下出血などを呈する。これを予防し、健康を維持するために、L-アスコルビン酸の推奨1日所要量(RDA)が定められ、それによれば我国では、成人男子60mg、成人女子50mgとされている。

L-アスコルビン酸の用途は、単に必須栄養素としてのビタミンC強化剤にとどまらず、その化学構造、生理作用から、例えば、酸味剤、還元剤、酸化防止剤、漂白剤、安定剤などとして各種化学反応基材、飲食物などに、また、ウイルス性疾患、細菌性疾患、悪性腫瘍など感受性疾患の予防剤、治療剤すなわち抗感受性疾患剤に、更には、還元剤、紫外線吸収剤、メラニン生成抑制剤などの美肌剤、色白剤などとして化粧品にまで及び、その範囲は極めて広い。

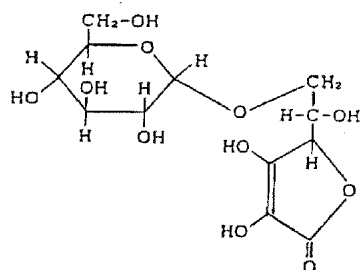
L-アスコルビン酸の最大の欠点は、それが直接

還元性を示すため、極めて不安定で、酸化分解を受け易く、容易にその生理活性を失うことである。

L-アスコルビン酸を安定化させる方法として、L-アスコルビン酸の糖誘導体が提案されている。例えば、先に本発明者等が、「ビタミン」第43巻、第205乃至209頁(1971年)、「ビタミン」第47巻、第259乃至267頁(1973年)および特公昭48-38158号公報で、生化学的手法によるL-アスコルビン酸グルコシドの合成法を開示している。

しかしながら、これらのアスコルビン酸グルコシドは、いずれも同様の方法で調製され、得られたアスコルビン酸については、例えば、該公報第2例第14乃至16行で、「得た誘導体はアスコルビン酸の8番の炭素の第1アルコール基がエーテル結合によりグルコシドを形成したものと」記載され、また、その生成がマルトースから $\alpha$ -グリコシル基の糖転移反応であること、更には、直接還元性を示す性質を有するなどから、その化学構造が、

式[II]:



で示されるものであると考えられ、その安定化の程度についても、該公報実施例1の表の結果から明らかなように、L-アスコルビン酸よりは優れているものの、なお不安定であり、未だ実用化されるに至っていない。

また、石戸等が特公昭58-5920号公報で、有機化学的手法によるL-アスコルビン酸糖誘導体の合成法を開示している。

しかしながら、このアスコルビン酸糖誘導体は、該公報第7欄第6行乃至第8欄第11行で、2,3-ジ-

O-(β-D-グルコピラノシル)-L-アスコルビン酸など21種類ものβ-D-グルコピラノシル型のL-アスコルビン酸糖誘導体を掲げて説明していることから明らかなように、すべてのD-グルコースがβ結合しているL-アスコルビン酸糖誘導体である。

また、政本等が特開昭58-198498号公報で有機化学的手法によるL-アスコルビン酸糖誘導体の合成法を開示しているが、これもβ-グルコシル型のL-アスコルビン酸糖誘導体である。

また、これらβ-D-グルコピラノシル型のL-アスコルビン酸糖誘導体について、本発明者等が検討したところ、生体、とりわけ、ヒトにおいて、生理活性を充分発揮させることの困難なことが判明した。更に、その有機化学的手法による合成法は、反応が複雑で収率も低く、それ故に、経済性が劣り、加えて、その誘導体の無毒性、安全性を確保する上において、相当の困難が伴う欠点のあることも判明した。

叙上のように、従来知られているL-アスコルビ

ン酸糖誘導体の提案は、安定性、安全性、生理活性、経済性などの点で、いずれも不十分であり、その実現を見るに至っていない。

[発明が解決しようとする課題]

従来のL-アスコルビン酸糖誘導体の欠点を解消し、安定性に優れ、生体内でL-アスコルビン酸の生理活性を充分発揮し、しかも無毒で安心して利用できるL-アスコルビン酸糖誘導体の実現が強く望まれている。

[課題を解決するための手段]

本発明は、従来のL-アスコルビン酸糖誘導体の欠点を解消するためになされたものであって、とりわけ、生化学的手法による糖転移反応を利用し、新しいL-アスコルビン酸糖誘導体を目指して鋭意研究を続けてきた。

その結果、直接還元性を示さず、安定性に優れ、しかも生体内で容易に加水分解され、生理活性の点でも申し分のない新規L-アスコルビン酸糖誘導体を見出し、更に、その製造方法並びに飲食物、抗感受性疾患剤、化粧品などへの用途を確立して

本発明を完成した。

また、本発明のα-グリコシル-L-アスコルビン酸が、L-アスコルビン酸とα-グルコシル糖化合物とを経口摂取することにより、生体内で生成され、代謝される物質であることが判明したことにより、本発明のα-グリコシル-L-アスコルビン酸は、本来、生体物質であり、安全性の上からも理想的なL-アスコルビン酸の新規糖誘導体と云うことができる。

ちなみに、有機化学的手法によって合成されるβ-D-グルコシル型のL-アスコルビン酸糖誘導体は、生体内で生成されず、従って、生体にとっては異物と考えられる。

本発明のα-グリコシル-L-アスコルビン酸はその製法を問わず、生化学的手法による製法であっても、有機化学的手法による製法であってもよい。

しかし、一般的には、安全性、経済性の上から、L-アスコルビン酸とα-グルコシル糖化合物とを含有する溶液に糖転移酵素を作用させる生化学的手法により生成させるのが望ましい。

本明細書でいう直接還元性を示さないとは、L-アスコルビン酸の場合とは違って、そのまま、2,6-ジクロロフェノールインドフェノールを還元脱色しないことを意味する。

本明細書でいうL-アスコルビン酸とは、特に不都合が生じない限り、遊離のL-アスコルビン酸のみならず、L-アスコルビン酸のアルカリ金属塩若しくはアルカリ土類金属塩などのL-アスコルビン酸塩、または、それらの混合物を意味する。従って、本発明の糖転移反応に用いるL-アスコルビン酸としては、通常、遊離のL-アスコルビン酸だけでなく、必要に応じて、L-アスコルビン酸ナトリウム、L-アスコルビン酸カルシウムなどが適宜用いられる。

また同様に、本明細書でいう $\alpha$ -グルコシル-L-アスコルビン酸、2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸などについても、特に不都合が生じない限り、遊離の酸のみならず、それらの塩をも意味する。

本発明で用いる $\alpha$ -グルコシル糖化合物は、同

時に用いる糖転移酵素によってL-アスコルビン酸から直接還元性を示さない $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸を生成できるものであればよく、例えば、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオース、マルトオクタオースなどのマルトオリゴ糖、デキストリン、シクロデキストリン、アミロースなどの澱粉部分加水分解物、更には、液化澱粉、糊化澱粉、溶性澱粉などが適宜選択できる。

従って、 $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸の生成を容易にするためには、糖転移酵素に好適な $\alpha$ -グルコシル糖化合物が選ばれる。

例えば、糖転移酵素として、 $\alpha$ -グルコシダーゼ(EC 3.2.1.20)を用いる際には、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオース、マルトオクタオースなどのマルトオリゴ糖、または、DE約5乃至60のデキストリン、澱粉部分加水分解物などが好適であり、シクロマルト

デキストリン・グルカノトランスフェラーゼ(EC 2.4.1.19)を用いる際には、シクロデキストリンまたはDE1未満の澱粉糊化物からDE約80のデキストリンまでの澱粉部分加水分解物などが好適であり、 $\alpha$ -アミラーゼ(EC 3.2.1.1)を用いる際には、DE1未満の糊化澱粉からDE約30のデキストリンまでの澱粉部分加水分解物などが好適である。

反応時のL-アスコルビン酸の濃度は、通常、1V/V%以上、望ましくは、約2乃至30V/V%含有しておればよく、 $\alpha$ -グルコシル糖化合物の濃度は、L-アスコルビン酸に対して、通常、約0.5乃至30倍の範囲が好適である。

本発明に用いる糖転移酵素は、L-アスコルビン酸とこの酵素に好適な $\alpha$ -グルコシル糖化合物とを含有する溶液に作用させる時、L-アスコルビン酸を分解せずに、L-アスコルビン酸の少なくとも2位の炭素のアルコール基に $\alpha$ -グルコシル基を1乃至数個転移して $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸を生成するものであればよい。

例えば、 $\alpha$ -グルコシダーゼは、マウスの腎臓、

ラットの腸粘膜、イヌ、ブタの小腸など動物由来の酵素、コメ種子、トウモロコシ種子など植物由来の酵素、更には、ムコール(Mucor)属、ペニシリウム(Penicillium)属などに属するカビ、またはサッカロミセス(Saccharomyces)属などに属する酵母などの微生物を栄養培地で培養し得られる培養物由来の酵素が、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼは、バチルス(Bacillus)属、クレブシーラ(Klebsiella)属などに属する細菌培養物由来の酵素が、 $\alpha$ -アミラーゼは、バチルス属などに属する細菌培養物由来の酵素などが適宜選択できる。

これらの糖転移酵素は、前記の条件を満足しさえすれば、必ずしも精製して使用する必要はなく、通常は、粗酵素で本発明の目的を達成することができる。必要ならば、公知の各種方法で精製して使用してもよい。また、市販の糖転移酵素を利用することもできる。使用酵素量と反応時間とは、密接な関係があり、通常は、経済性の点から約3乃至80時間で反応を終了するように酵素量が選ばれ

る。

また、固定化された糖転移酵素をバッチ式で繰り返し、または連続式で反応に利用することも有利に実施できる。

本発明の反応方法は、通常、前述のL-アスコルビン酸と $\alpha$ -グルコシル糖化合物とを含有する溶液に糖転移酵素を加え、該酵素が充分作用する条件、通常、pH約3乃至9、温度約30乃至80℃の範囲から選ばれる条件に維持して行う。また、反応中にL-アスコルビン酸が酸化分解を受け易いので、できるだけ嫌気または還元状態で遮光下に維持するのが望ましく、必要ならば、チオ尿素、亜硫酸塩などを共存させて反応させることも有利に実施できる。

また、必要ならば、糖転移反応能を有する微生物の増殖中に、L-アスコルビン酸と $\alpha$ -グルコシル糖化合物とを共存させて、その目的物質を生成させることも有利に実施できる。

本発明の直接還元性を示さない $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸について述べると、L-アスコ

ルビン酸の少なくとも2位の炭素のアルコール基に $\alpha$ -D-グルコシル基が結合し、その結合数は、1乃至7個程度のグルコシル基が $\alpha$ -1,4結合しており、その個々の物質としては、例えば、2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸、2-O- $\alpha$ -D-マルトシル-L-アスコルビン酸、2-O- $\alpha$ -D-マルトトリオシル-L-アスコルビン酸、2-O- $\alpha$ -D-マルトテトラオシル-L-アスコルビン酸、2-O- $\alpha$ -D-マルトペンタオシル-L-アスコルビン酸、2-O- $\alpha$ -D-マルトヘキサオシル-L-アスコルビン酸、2-O- $\alpha$ -D-マルトヘプタオシル-L-アスコルビン酸などである。 $\alpha$ -グルコシダーゼによって生成させる場合には、通常、2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸だけを生成させることができるし、必要により、2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸に、2-O- $\alpha$ -D-マルトシル-L-アスコルビン酸、2-O- $\alpha$ -D-マルトトリオシル-L-アスコルビン酸などを混在して生成させることもできる。

シクロマルトデキストリン・グルカノトランス

フェラーゼや $\alpha$ -アミラーゼによって生成させる場合には、一般に、 $\alpha$ -グルコシダーゼの場合よりも $\alpha$ -D-グルコシル基の結合数の大きいものまで混在生成させることができ、使用する $\alpha$ -グルコシル糖化合物によっても変動するが、一般的には、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼの場合には、 $\alpha$ -D-グルコシル基の数が1乃至7程度まで分布し、 $\alpha$ -アミラーゼの場合には、これよりその分布がやや狭い程度である。このような混合物である生成物を、必要によって、 $\alpha$ -アミラーゼ(EC 3.2.1.1)、 $\beta$ -アミラーゼ(EC 3.2.1.2)、グルコアミラーゼ(EC 3.2.1.3)などによって、部分加水分解し、その $\alpha$ -D-グルコシル基の数を低減させることができる。例えば、グルコアミラーゼを作用させる場合には、2-O- $\alpha$ -D-マルトシル-L-アスコルビン酸以上の高分子物を加水分解し、2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸を蓄積生成させることができ、また、 $\beta$ -アミラーゼを作用させる場合には、主に、2-O- $\alpha$ -D-マルトテトラオシル-L-アス

コルビン酸以上の高分子物を加水分解し、2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸、2-O- $\alpha$ -D-マルトシル-L-アスコルビン酸および2-O- $\alpha$ -D-マルトトリオシル-L-アスコルビン酸の混合物を蓄積生成させることができる。

以上述べたように、各種方法により生成せしめた直接還元性を示さない $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸含有溶液は、一般に、 $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸のみならず、未反応のL-アスコルビン酸、 $\alpha$ -グルコシル糖化合物などを含有しているけれども、そのまま、 $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸含有製品にすることができる。通常は、反応溶液を加熱するなどして酵素を失活させ、濾過、濃縮してシラップ状の、更には、乾燥、粉末化して粉末状の $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸含有製品にする。

更に、精製された $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸製品を製造する場合には、 $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸と未反応のL-アスコルビン酸、D-グルコース、 $\alpha$ -グルコシル糖化合物など夾雑

物との分子量、親和性などの違いを利用する分離手段、例えば、膜分離、カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどの方法で分離精製すれば、高純度の製品を得ることも容易に達成することができる。この際、分離されるL-アスコルビン酸、 $\alpha$ -グルコシル糖化合物などを、再度、糖転移反応の原料として用いることも有利に実施できる。また、糖転移反応終了後、クロマトグラフィーなどの分離手段にかけるまでの間に、必要ならば、例えば、反応液を加熱して生じる不溶物を濾過して除去したり、活性炭などで処理して反応液中の蛋白性物質、着色物質などを吸着除去したり、陽イオン交換樹脂(H型)で脱ミネラルしたり、陰イオン交換樹脂(OH型)に吸着させ、アニオン若しくは塩類溶液などで脱着処理するなどの精製法を組合せて利用することも随意である。

このようにして得られる $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸は次の特長を有している。

- (1) 直接還元性を示さず、きわめて安定である。L-アスコルビン酸とは違って、メイラード反応を起こしにくい。従って、アミノ酸、ペプチド、蛋白質、脂質、糖質、生理活性物質などと共存しても無用の反応を起さず、むしろ、これら物質を安定化する。
- (2) 加水分解を受けてL-アスコルビン酸を生成し、L-アスコルビン酸と同様の還元作用、抗酸化作用を示す。
- (3) 体内の酵素により、L-アスコルビン酸とD-グルコースとに容易に加水分解され、L-アスコルビン酸本来の生理活性を示す。
- (4) L-アスコルビン酸と $\alpha$ -グルコシル糖化合物などを経口摂取することにより、生体内で生成され、代謝される物質であることから、その安全性は極めて高い。
- (5)  $\alpha$ -グルコシル糖化合物などの糖類を含有する製品の場合には、 $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸の効果を発揮するのみならず、糖類が賦形、増量効果や、甘味効果を発揮することが

でき、また、糖類を除去した精製製品の場合には、賦形、増量効果は低いものの、少量で $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸本来の効果を発揮することができる。

これらの特長から、直接還元性を示さない $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸は、安定性、安全性の高い天然型のビタミンC強化剤としてばかりでなく、呈味改善剤、酸味剤、安定剤、品質改良剤、抗酸化剤、紫外線吸収剤などとして、飲食物、嗜好物、また、ウイルス性疾患、細菌性疾患、悪性腫瘍など感受性疾患の予防剤、治療剤、更には、美肌剤、色白剤などの化粧品などに配合して、望ましくは、0.001W/V%以上配合して有利に利用できる。

また、 $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸は、酸味、塩から味、渋味、旨味、苦味などの呈味を有する各種物質ともよく調和し、耐酸性、耐熱性も大きいので、普通一般の飲食物、嗜好物、例えば、醬油、粉末醬油、味噌、粉末味噌、もろみ、ひしお、フリカケ、マヨネーズ、ドレッシング、

食酢、三杯酢、粉末すし酢、中華の素、天つゆ、麺つゆ、ソース、ケチャップ、焼肉のタレ、カレーウ、シチューの素、スープの素、ダシの素、複合調味料、みりん、新みりん、テーブルシュガー、コーヒーシュガーなどの各種調味料、せんべい、あられ、おこし、カリントウ、求肥、餅類、まんじゅう、ういろう、あん類、羊羹、水羊羹、錦玉、ゼリー、カステラ、飴玉などの各種和菓子、パン、ビスケット、クラッカー、クッキー、パイ、プリン、シュークリーム、ワッフル、スポンジケーキ、ドーナツ、チョコレート、チューインガム、キャラメル、キャンデーなどの各種洋菓子、アイスクリーム、シャーベットなどの氷菓、果実のシロップ漬、氷蜜などのシロップ類、バタークリーム、カスタードクリーム、フラワーペースト、ピーナツペースト、フルーツペーストなどのスプレッド、ペースト類、ジャム、マーマレード、シロップ漬、糖果などの果実、野菜の加工食品類、パン類、麺類、米飯類、人造肉などの穀類加工食品類、サラダオイル、マーガリンなどの油脂食品類、福神漬、

べったら漬、干枚漬、らっきょう漬などの漬物類、たくあん漬の素、白菜漬の素などの漬物の素類、ハム、ソーセージなどの畜肉製品類、魚肉ハム、魚肉ソーセージ、カマボコ、チクワ、ハンペンなどの魚肉製品、ウニ、イカの塩辛、酢コンブ、さきするめ、ふぐのみりん干しなどの各種珍味類、のり、山菜、するめ、小魚、貝などで製造されるつくだ煮類、煮豆、ポテトサラダ、コンブ巻、天ぷらなどのそう菜食品、錦糸卵、乳飲料、バター、チーズなどの卵、乳製品、魚肉、畜肉、果実、野菜などのビン詰、缶詰類、合成酒、増醸酒、果実酒、洋酒などの酒類、コーヒー、ココア、ジュース、炭酸飲料、乳酸飲料、乳酸菌飲料などの清涼飲料水、プリンミックス、ホットケーキミックス、即席ジュース、即席コーヒー、即席しるこ、即席スープなど即席飲食品などに、ビタミンC強化剤、呈味改善剤、酸味剤、品質改良剤、安定剤、抗酸化剤などの目的で有利に利用することができる。また、家畜、家禽、蜜蜂、蚕、魚などの飼育動物のための飼料、餌料などにビタミンC強化剤、呈味

改善剤、抗酸化剤、嗜好性向上などの目的で配合して利用することも好都合である。

その他、タバコ、トローチ、肝油ドロップ、複合ビタミン剤、口中清涼剤、口中香錠、うがい薬、経管栄養剤、内服薬、注射剤、練嚙みがき、口紅、アイシャドウ、乳液、化粧水、クリーム、ファウンデーション、日焼け止め、洗顔石鹸、シャンプー、リンスなど各種固状、ペースト状、液状の嗜好物、感受性疾患の予防剤、治療剤すなわち抗感受性疾患剤、美肌剤、色白剤などの化粧品などに配合して利用することも有利に実施でき、更には、紫外線吸収剤、劣化防止剤などとしてプラスチック製品などに配合して利用することも、 $\alpha$ -グリコシド加水分解酵素の測定用基質などに利用することも有利に実施できる。

また、本発明でいう感受性疾患とは、 $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸によって予防され若しくは治療される疾患であり、それが、例えばウイルス性疾患、細菌性疾患、外傷性疾患、免疫疾患、アレルギー疾患、糖尿病、白内障、悪性腫瘍など

であってもよい。 $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸感受性疾患の予防剤若しくは治療剤は、その目的に応じてその形状を自由に選択できる。例えば、噴霧剤、点眼剤、点鼻剤、うがい剤、注射剤などの液剤、軟膏、はっけ剤、クリームのようなペースト剤、粉剤、顆粒、カプセル剤、錠剤などの固剤などである。製剤に当たっては、必要に応じて、他の成分、例えば、治療剤、生理活性物質、抗生物質、補助剤、増量剤、安定剤、着色剤、着香剤などの1種若しくは2種以上と併用することも随意である。

投与量は、含量、投与経路、投与頻度などによって適宜調節することができる。通常、成人1日当り、約0.001乃至100グラムの範囲が好適である。

また、化粧品の場合も、大体、前述の予防剤、治療剤に準じて利用することができる。

$\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸を含有せしめる方法としては、それらの製品が完成するまでの工程で、例えば、混和、混捏、溶解、浸漬、散布、塗布、噴霧、注入など公知の方法が適宜選ば

れる。

また、本発明の $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸、または、2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸が、遊離の酸の場合には、必要により、これを水酸化金属、炭酸金属などの水溶液と反応させて、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の塩、例えば、ナトリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、鉄塩、銅塩、亜鉛塩などにして、pH調整するとともにビタミンC作用とミネラルとを併せ持つ物質を調製し、これを栄養強化剤、化学薬品などとして利用することも有利に実施できる。

以下、本発明の直接還元性を示さない $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸の代表例を実験を用いて詳細に説明する。

#### 実験 1 $\alpha$ -グルコシダーゼ標品

ラットの小腸を0.1Nリン酸緩衝液(pH7.0)に20V/V%になるように加え、これをホモゲナイザーで均質化し、遠心分離(4,000×g、10分間)し、この上清にメルク社製トリプシンを終末濃度0.1g/L



になるよう加えて室温下で4時間維持し、次いで冷エタノールを2倍容加え、遠心分離し、この沈殿を0.01Mリン酸塩緩衝液(pH7.0)に溶かして、半透膜に入れ、同緩衝液に対して15時間透析した。

その後、常法に従って、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーにかけ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性画分を採取し、これを凍結乾燥したものを $\alpha$ -グルコシダーゼ標品とした。

本品は比活性60.6(単位/mg蛋白質)で、精製倍率460倍、活性収率約47%であった。

ここでいう活性1単位とは、1.35mM EDTAを含む0.1M酢酸塩緩衝液(pH6.0)750 $\mu$ Lと4W/V%マルトース250 $\mu$ Lとの混液に、適当に希釈した酵素液100 $\mu$ Lを加え、37℃で30分間反応させた後、沸騰水に3分間保って反応を停止させ、これを遠心分離し、その上清20 $\mu$ Lを採り、これに発色試薬(グルコースオキシダーゼ法、和光純薬社製、商品名グルコースBテスト)1mLを加えて、37℃に20分間保って発色させ、次いで505nmにおける吸光度を測定

する条件で、37℃、1分間に1 $\mu$ moleのグルコースを遊離する酵素量をいう。

## 実験 2 $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸

### (1) 糖転移反応

L-アスコルビン酸7.04重量部、マルトース12.8重量部およびチオ尿素0.2重量部を0.2M酢酸緩衝液(pH5.3)100重量部に溶解し、更に、実験1の方法で調製した部分精製 $\alpha$ -グルコシダーゼ標品をマルトースグラム当り0.5単位加え、遮光下、50℃で5時間反応させた。次いで、4倍容の1.06W/V%メタリン酸溶液を加え酵素を失活させて反応を停止した。

本品を高速液体クロマトグラフィーで測定したところ、反応に用いたL-アスコルビン酸の約30%が糖誘導体に変換していた。

### (2) 精製

(1)の反応停止液を、Bio-Rad社製造のゲル濾過剤(商品名Bio-Gel P-2)を用いて、水を溶出液としてゲル濾過クロマトグラフィーを行ない、 $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸の

高含有画分を採取し、次いで島津製作所社製造のカラム(商品名Shim-pack ODS)を用いて、0.3W/V%酢酸を溶出液として高速液体クロマトグラフィーを行ない、 $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸高含有画分を採取し、減圧濃縮し、凍結乾燥し粉末化して、純度99.9%の高純度 $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸標品を、反応液中の $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸に対して、収率約80W/V%で得た。

### (3) 理化学的性質

本発明の $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸の代表例として、(2)で調製した高純度 $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸標品を用いて、次に示す理化学的性質を調べた。

なお、 $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸よりも $\alpha$ -D-グルコシル基の数の大きいものの例として、実施例A-1の方法で得た $\alpha$ -D-グリコシル-L-アスコルビン酸を用いて、できるだけ調べ、その性質をカッコ内[ ]に示した。

・元素分析： $C_{12}H_{16}O_{11}$ として

理論値C=42.6% H=5.36%

実測値C=42.3% H=5.38%

N<0.01%

・分子量：質量分析装置(日立製作所製、M-80B)を用いてFDマスマスペクトルを測定した結果、 $(M+H)^+(C_{12}H_{16}O_{11})$  MW=338)として339が観測された。

・紫外線吸収スペクトル：pH7.0で260nmに、pH2.0で238nmに吸収極大を示す。

[本性質と実質的に同一の性質を示す。]

・赤外線吸収スペクトル：KBr錠剤法で測定した。結果は、図に示す。

[本性質と実質的に同一の性質を示す。]

・NMR：NMR測定装置(日本電子製、JNM-GX400)を用いて測定した。

測定溶媒は重水を用い、測定時の溶液のpHは2.8であった。

内部標準としてTSP(sodium 3-trimethylsilylpropionate-2, 2, 3, 3-d<sub>4</sub>)を用いた。

<sup>1</sup>H-NMR  $\delta$ ppm (D<sub>2</sub>O)

- 3.50 (1H, dd, J=9.5, J=9.7 Hz)  
 3.56 (1H, dd, J=3.4, J=9.5 Hz)  
 3.75 (2H, d, J=6.4 Hz)  
 3.78 (2H, d, J=3.0 Hz)  
 3.86 (1H, dd, J=9.5, J=9.5 Hz)  
 4.02 (1H, dt, J=9.7, J=3.0 Hz)  
 4.08 (1H, td, J=6.4, J=1.5 Hz)  
 4.91 (1H, d, J=1.5 Hz)  
 5.52 (1H, d, J=3.4 Hz)

・解離定数:  $pK_a=3.0$

この値を、ゼイ・ゼルノウ (J. Jernow) 等、テトラヘドロン (Tetrahedron) 第35巻、第1483乃至1486頁 (1979年) の第1表およびパオーウェン・ルー (Pao-Wen Lu) 等、ジャーナル・アグリカルチュラル・フード・ケミストリー (Journal of Agricultural Food Chemistry) 第32巻、第21乃至28頁 (1984年) の第2表に示される各種アスコルビン酸誘導体の解離定数 ( $pK_a$ ) を参照すると、本物質の場合には、そのアスコルビン酸部分の2位のアルコール基が $\alpha$ -

D-グルコシル結合に関与し、3位のアルコール基は遊離のままであると判断される。

#### ・メチル化分析

前述のパオーウェン・ルー (Pao-Wen Lu) 等の文献に記載されているL-アスコルビン酸をジアゾメタンによりメチル化して主に3-O-メチル-L-アスコルビン酸を生成するメチル化反応の方法により、本物質をメチル化し、次いで、得られるメチル化物を加水分解して分析したところ、主として、3-O-メチル-L-アスコルビン酸とD-グルコースとを生成した。

これらNMR、解離定数、メチル化分析のデータから、L-アスコルビン酸の2位の炭素のアルコール基がエーテル結合によりD-グルコースと $\alpha$ -グルコシド結合を形成しているものと判断される。

・溶剤に対する溶解性: 水、0.1N-カセイソーダ、0.1N-酢酸に易溶、メタノール、エタノールに微溶、エーテル、ベンゼン、クロロホルム、酢酸エチルに不溶。

〔本性質と実質的に同一の性質を示す。〕

・呈色反応: 直接還元性を示さず、2,6-ジクロロフェノールインドフェノールを還元脱色しない。2,4-ジニトロフェニルヒドラジン反応を示さない。アントロン硫酸反応で緑色を呈する。

〔本性質と実質的に同一の性質を示す。〕

#### ・安定性:

(a)  $\alpha$ -グルコシダーゼ作用または1N-塩酸、100℃、5分間処理により加水分解され、L-アスコルビン酸とD-グルコースとをモル比1:1で生成する。

〔グルコアミラーゼにより加水分解され、2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸とD-グルコースとを生成する。〕

(b)  $\beta$ -グルコシダーゼによっては加水分解されない。

〔本性質と実質的に同一の性質を示す。〕

(c) 2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸と、特公昭48-38158号公報で開示さ

れている6-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸およびL-アスコルビン酸との水溶液中での安定性を比較した。すなわち、それぞれの試料を濃度70  $\mu$ M、pH7.0またはpH2.0に調整して吸光光度計用セルに採り、これを20℃に維持して経時的に吸光光度計によりpH7.0の場合260nmで、pH2.0の場合245nmで吸光度を測定し、その残存率(%)を測定し比較した。結果は表に示す。

表

時間(h)	pH	0	0.25	0.5	1.0	21.0
7.0	2GAsA	100%	100%	100%	100%	100%
	6GAsA	100%	58%	36%	17%	8%
	AsA	100%	47%	20%	8%	2%
2.0	2GAsA	100%	100%	100%	100%	100%
	6GAsA	100%	99%	98%	91%	55%
	AsA	100%	99%	97%	87%	10%

(注) 2GAsAは、本発明の2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸を意味し、6GAsAは、対照の6-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸を、AsAは、対照のL-アスコルビン酸を意味する。

表の結果からも明らかなように、2-0- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸は、6-0- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸、L-アスコルビン酸のいずれとも違って、水溶液中できわめて安定である。

[2-0- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸の性質と実質的に同一の性質を示す。]

#### ・生理活性

##### (a) チトクロームC還元活性

2-0- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸と、6-0- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸およびL-アスコルビン酸とを用いて、チトクロームCの還元活性を比較した。

すなわち、0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.8)-0.2mM EDTA 0.5mL、0.1mMチトクロームC 0.1mL、一定量の水を加えて終末液量1mLとし、これにそれぞれの試料10mMを含む10 $\mu$ Lを加え、室温にて550nmにおける吸光度の変化を分光光度計

にて測定し比較した。還元活性は、反応初速度より吸光度差( $\Delta A$ )/分/10 $\mu$ Lを求め判定した。

その結果、2-0- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸は、6-0- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸、L-アスコルビン酸のいずれとも違って、還元活性を示さないことが判明した。

なお、2-0- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸は、実験1の方法で調製した $\alpha$ -グルコシダーゼ標品により加水分解されると、この還元活性を示すことが判明した。

##### (b) コラーゲン合成活性

2-0- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸と、6-0- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸およびL-アスコルビン酸とを用いて、コラーゲン合成活性を調べた。

すなわち、イーグルMEM(10%FBS含有)

培地中でヒトの線維芽細胞( $7 \times 10^4$ 細胞/プレート)を1週間培養し、これに $^3$ H-プロリンをmL当り4 $\mu$ Ci、 $\beta$ -アミノプロピオニトリルをmL当り20 $\mu$ gおよびそれぞれの試料を0.25mMになるように加え、更に、24時間培養した。これに10V/V%トリクロロ酢酸を加え、培養物中のコラーゲン成分を回収し、凍結乾燥した。この標品を溶解し、pHを調整後、37 $^{\circ}$ C、90分間コラーゲナーゼ(III型)処理を行ない、遠心分離し、この上清に含まれる放射能を測定しコラーゲン合成活性を求めた。

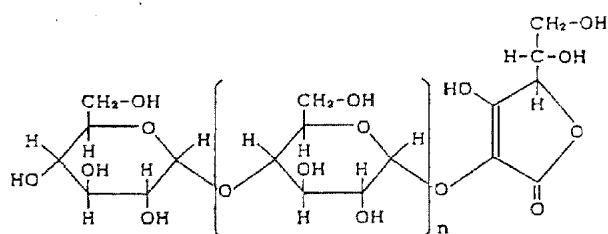
その結果、2-0- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸は、アスコルビン酸と同等のコラーゲン合成活性を有していることが判明した。

なお、6-0- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸のコラーゲン合成活性は、これらよりやや劣る傾向にあった。

以上の理化学的性質から、本実験で調製した直

接還元性を示さない $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸は、

式[III]:

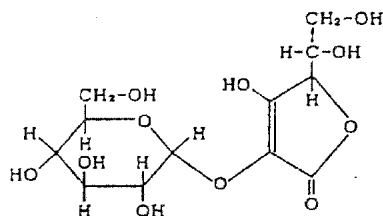


ただし、nは0または1乃至6から選ばれる整数

で示される化学構造を有している。

また、その代表例としての2-0- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸は、

式[N]：



で示される化学構造を有している。

### 実験 3 生体内での生成

ラットに、L-アスコルビン酸1gとマルトース500mg (10W/V%液、5mL) とを経口投与し、経時的に採血し、遠心分離し、その上清(血漿)を用いて、高速液体クロマトグラフィーで確認したところ、 $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸および少量の $\alpha$ -D-マルトシル-L-アスコルビン酸に相当するピークは、経口投与後30分頃から認められ、180分で最高に達し、その後、急激に減少し、360

とが判明した。

以下、本発明の実施例として、直接還元性を示さない $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸の製造例を実施例Aで、その用途例を実施例Bで述べる。

### 実施例 A-1 $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸

$\alpha$ -シクロデキストリン9重量部を水20重量部に加熱溶解し、還元下に保って、L-アスコルビン酸3重量部を加え、pH5.5、80℃に維持しつつ、これに、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ(株式会社林原生物化学研究所販売)を $\alpha$ -シクロデキストリングラム当たり150単位加えて40時間反応させた。反応液を高速液体クロマトグラフィー(島津製作所製、LC-8;カラム,YMC AQ 303 ODS;溶離液,0.1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{H}_3\text{PO}_4$  (pH2.0);流速,0.5mL/min;検出,日本分光工業(株)MULT-340)で分析したところ、L-アスコルビン酸が9.5分の位置に現れたのに対し、新たに生成した $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸が11.2分、 $\alpha$ -D-マルトシル-L-アスコルビン酸が15.7分、 $\alpha$ -D-

分で血液の中から消失した。

このピークのうち、大部分を占める $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸を示す物質を単離し、詳細に調べたところ、前述の2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸の理化学的性質と同一であることが判明した。

従って、 $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸は、生体内で生成され、代謝され、消失する生体物質であることから、その安全性は極めて高いものであると言える。

### 実験 4 急性毒性テスト

7周令のdd系マウスを使用して、実験2(2)の方法で調製した高純度 $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸標品を経口投与して急性毒性テストをしたところ、5gまで死亡例は見られず、これ以上の投与は困難であった。

従って、本物質の毒性は極めて低い。

なお、実施例A-1の方法で製造した $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸を用いて本テストを行ったところ、同様の結果を得、毒性の極めて低いこ

マルトトリオシル-L-アスコルビン酸が20.6分、 $\alpha$ -D-マルトテトラオシル-L-アスコルビン酸が24.9分、 $\alpha$ -D-マルトペンタオシル-L-アスコルビン酸が28.1分、 $\alpha$ -D-マルトヘキサオシル-L-アスコルビン酸が32.1分および $\alpha$ -D-マルトヘプタオシル-L-アスコルビン酸が38.6分の位置に現れた。L-アスコルビン酸の約50%がこれら $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸へ変換していた。本反応液を加熱して酵素を失活させ、濾過し、濾液を実験2(2)の方法に準じて $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸の各成分を精製単離し、混合して各成分を含有した $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸を採取し、これを減圧濃縮、粉末化して $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸の粉末製品を、固形物当たり、原料のL-アスコルビン酸に対して約90W/V%の収率で得た。

本品は、直接還元性を示さず、安定性、生理活性も充分で、ビタミンC強化剤としてばかりでなく、安定剤、品質改良剤、抗酸化剤、生理活性剤、紫外線吸収剤などとして、飲食物、抗感受性疾患剤、

化粧品などに有利に利用できる。

#### 実施例 A-2 $\alpha$ -グリコシル- $\text{L}$ -アスコルビン酸

デキストリン (DE約6) 40重量部を水50重量部に加熱溶解し、還元下に保って、 $\text{L}$ -アスコルビン酸13重量部を加え、 $\text{pH}$ 5.6、65℃に維持しつつ、これに、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼをデキストリングラム当り270単位加えて、40時間反応させた。反応液を、実施例A-1と同様に高速液体クロマトグラフィーで分析したところ、 $\text{L}$ -アスコルビン酸の約65%が、実施例A-1と同様に、 $\alpha$ -D-グルコシル- $\text{L}$ -アスコルビン酸、 $\alpha$ -D-マルトシル- $\text{L}$ -アスコルビン酸、 $\alpha$ -D-マルトトリオシル- $\text{L}$ -アスコルビン酸、 $\alpha$ -D-マルトテトラオシル- $\text{L}$ -アスコルビン酸、 $\alpha$ -D-マルトペンタオシル- $\text{L}$ -アスコルビン酸、 $\alpha$ -D-マルトヘキサオシル- $\text{L}$ -アスコルビン酸などの $\alpha$ -グリコシル- $\text{L}$ -アスコルビン酸に変換していた。反応液を加熱し酵素を失活させ、濾過し、濾液を常法により活性炭で脱色精製し、濃縮して、シラッ

ピン酸は、2-O- $\alpha$ -D-グルコシル- $\text{L}$ -アスコルビン酸に変換していた。

反応液を加熱して酵素を失活させ、濾過し、濾液を実験2(2)の方法に準じて精製し、2-O- $\alpha$ -D-グルコシル- $\text{L}$ -アスコルビン酸高含有画分を採取し、減圧濃縮し、粉末化して、純度99.0%以上の高純度2-O- $\alpha$ -D-グルコシル- $\text{L}$ -アスコルビン酸を原料の $\text{L}$ -アスコルビン酸に対して約80V/V%の収率で得た。

本品の理化学的性質を調べたところ、実験2(3)で示す2-O- $\alpha$ -D-グルコシル- $\text{L}$ -アスコルビン酸と実質的に同一であった。

本2-O- $\alpha$ -D-グルコシル- $\text{L}$ -アスコルビン酸は、直接還元性を示さず、安定性、生理活性も充分なビタミンC強化剤として、安定剤、品質改良剤、抗酸化剤、生理活性剤、紫外線吸収剤、化学用品、医薬原料などとして、飲食物、抗感受性疾患剤、化粧品、試薬などに有利に利用できる。

#### 実施例 A-4 $\alpha$ -グリコシル- $\text{L}$ -アスコルビン酸

ブ状の $\alpha$ -グルコシル糖化合物を含有する $\alpha$ -グリコシル- $\text{L}$ -アスコルビン酸製品を固形物当り原料重量に対して約90V/V%で得た。

本品は、それに含まれる $\alpha$ -グリコシル- $\text{L}$ -アスコルビン酸が直接還元性を示さず、安定性、生理活性も充分で、ビタミンC強化剤としてばかりでなく、調味料、保湿剤、安定剤、品質改良剤、抗酸化剤、生理活性剤、紫外線吸収剤などとして、飲食物、抗感受性疾患剤、化粧品などに有利に利用できる。

#### 実施例 A-3 2-O- $\alpha$ -D-グルコシル- $\text{L}$ -アスコルビン酸

実施例A-2の方法に準じて調製したシラップ状の $\alpha$ -グルコシル糖化合物を含有する $\alpha$ -グリコシル- $\text{L}$ -アスコルビン酸製品1重量部を水4重量部に溶解し、これにグルコアミラーゼ(EC 3.2.1.3、東洋紡績株式会社販売)を該製品固形物グラム当り100単位加え、50℃、5時間反応させた。反応液を高速液体クロマトグラフィーで分析したところ、各成分を含んでいた $\alpha$ -グリコシル- $\text{L}$ -アスコル

デキストリン (DE18) 20重量部を水70重量部に加熱溶解し、還元下に保って、これに $\text{L}$ -アスコルビン酸10重量部と実験1の方法で調製した部分精製 $\alpha$ -グルコシダーゼをデキストリングラム当り4単位加え、遮光下、 $\text{pH}$ 5.0、50℃で8時間反応させた。次いで実施例A-2の方法に準じて精製し、濃縮、粉末化して粉末状の製品を収率約90V/V%で得た。

本品は、約10V/V%の $\alpha$ -グリコシル- $\text{L}$ -アスコルビン酸を含有していた。

本品は、それに含まれる $\alpha$ -グリコシル- $\text{L}$ -アスコルビン酸が直接還元性を示さず、安定性、抗酸化剤、生理活性も充分で、ビタミンC強化剤としてばかりでなく、調味料、保湿剤、安定剤、品質改良剤、抗酸化剤、生理活性剤、紫外線吸収剤などとして、飲食物、抗感受性疾患剤、化粧品などに有利に利用できる。

#### 実施例 A-5 $\alpha$ -グリコシル- $\text{L}$ -アスコルビン酸

マルトース10重量部を水80重量部に加熱溶解し、還元下に保って、これに $\text{L}$ -アスコルビン酸10重量

部とシグマ社製コメの種子由来の $\alpha$ -グルコシダーゼをマルトースグラム当り4単位加え、遮光下、pH 5.0、45℃で6時間反応させた。次いで実施例A-2の方法に準じて精製し、濃縮、粉末化して、粉末状の製品を収率約90V/V%で得た。本品は、約15%の $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸を含有していた。

本品は、それに含まれる $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸が直接還元性を示さず、安定性、生理活性も充分で、ビタミンC強化剤ばかりでなく、甘味剤、調味剤、保湿剤、安定剤、品質改良剤、抗酸化剤、生理活性剤、紫外線吸収剤などとして、飲食物、抗感受性疾患剤、化粧品などとして有利に利用できる。

#### 実施例 A-8 $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸

##### (1) $\alpha$ -グルコシダーゼ標品の調製

マルトース4V/V%、リン酸1カリウム0.1V/V%、硝酸アンモニウム0.1V/V%、硫酸マグネシウム0.05V/V%、塩化カリウム0.05V/V%、ポリペプトン0.2V/V%、

アスコルビン酸が直接還元性を示さず、安定性、生理活性も充分で、ビタミンC強化剤としてばかりでなく、甘味剤、調味剤、保湿剤、安定剤、品質改良剤、抗酸化剤、生理活性剤、紫外線吸収剤などとして、飲食物、抗感受性疾患剤、化粧品などとして有利に利用できる。

#### 実施例 B-1 チューインガム

ガムベース25重量部及び実施例A-8の方法で得た $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸含有粉末20重量部とを60℃でミキサーにより混練し、次いで、無水結晶マルチトール（林原商事株式会社販売、登録商標マビット）50重量部、リン酸カルシウム1.5重量部及び $\gamma$ -メントール $\beta$ -シクロデキストリン包接化合物0.1重量部を混合し、最後に調味料少量を混合して十分に混練し、ロール加工、裁断してチューインガムを得た。本品は、ビタミンCを強化したチューインガムであって、しかも低腐蝕性、低カロリーである。

#### 実施例 B-2 求肥

モチ米澱粉1重量部に水1.2重量部を混合し、加

炭酸カルシウム1V/V%（別に乾熱滅菌して接種時に無菌的に添加）および水からなる液体培地にムコール ジャバニカス（*Mucor javanicus*）IFO 4570を温度30℃で44時間振盪培養した。培養終了後、菌糸体を採取し、固定化 $\alpha$ -グルコシダーゼ標品とした。

##### (2) $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸の製造

マルトース（林原株式会社 登録商標サンマルト）40重量部を水70重量部に加熱溶解し、還元下に保って、これにL-アスコルビン酸10重量部と(1)の方法で調製した固定化 $\alpha$ -グルコシダーゼ標品をマルトースグラム当り10単位加え、遮光下、pH 5.5、50℃で3時間反応させた。

これを濾過し、固定化 $\alpha$ -グルコシダーゼ標品を回収し、再利用に回した。得られる濾液を加熱し、実施例A-2の方法に準じて精製し、濃縮、粉末化して、粉末状の製品を収率約95V/V%で得た。

本品は、約7V/V%の $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸を含有していた。

本品は、それに含まれる $\alpha$ -グリコシル-L-ア

スコルビン酸が直接還元性を示さず、安定性、生理活性も充分で、ビタミンC強化剤としてばかりでなく、甘味剤、調味剤、保湿剤、安定剤、品質改良剤、抗酸化剤、生理活性剤、紫外線吸収剤などとして、飲食物、抗感受性疾患剤、化粧品などとして有利に利用できる。

熟成化しつつ、これに砂糖1.5重量部、結晶性 $\beta$ -マルトース（林原株式会社製造、登録商標サンマルト）0.7重量部及び実施例A-2の方法で得た $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸含有シラップ0.5重量部を混和し、以後、常法に従って、成形、包装して求肥を製造した。

本品は、ビタミンCを強化した求肥で、老化が抑制され日持ちよく、口当り、風味良好なきびだんご風和菓子である。

#### 実施例 B-3 混合甘味料

はちみつ100重量部、異性化糖50重量部、黒砂糖2重量部及び実施例A-3の方法で得た高純度2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸粉末1重量部を混合して混合甘味料を得た。

本品は、ビタミンCを強化した甘味料で、健康食品として好適である。

#### 実施例 B-4 チョコレート

カカオペースト40重量部、カカオバター10重量部、無水結晶マルチトール50重量部及び実施例A-1の方法で得た $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン

酸含有粉末1重量部を混合してレファイナーに通して粒度を下けた後、コンチエに入れて50℃で二昼夜練り上げる。この間にレシチン0.5重量部を添加して十分に分散させた。次いで温度調節器で31℃に調節し、バターが固まる直前に型に流し込み、震動機でアワ抜きを行った後、10℃の冷却トンネルを20分間で通過させて固化させた。これを型抜きして包装し製品を得た。

本品は、吸湿性がなく、色、光沢共に良く、内部組織も良好であり、口中でなめらかに溶け、上品な甘味とまろやかな風味を有する。また、本品は、ビタミンCを強化したチョコレートであって、低カロリー、低腐蝕性である。

#### 実施例 B-5 サンドクリーム

結晶性 $\alpha$ -マルトース（林原株式会社製造、登録商標ファイントース）1,200重量部、ショートニング1,000重量部、実施例A-4の方法で得た $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸含有粉末10重量部、レシチン1重量部、レモンオイル1重量部、バニラオイル1重量部を常法により混和してサンドクリー

粒とした後、常法に従って、ゼラチンカプセルに封入して、一カプセル150mg入のカプセル剤を製造した。

本品は、血中コレステロール低下剤、免疫賦活剤、美肌剤などとして、感受性疾患の予防剤、治療剤、健康増進用食品などとして有利に利用できる。

#### 実施例 B-8 軟膏

酢酸ナトリウム・三水塩1重量部、DL-乳酸カルシウム4重量部をグリセリン10重量部と均一に混合し、この混合物を、ワセリン50重量部、木ロウ10重量部、ラノリン10重量部、ゴマ油14.5重量部、実施例A-4の方法で得た $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸含有粉末1重量部及びハッカ油0.5重量部の混合物に加えて、更に均一に混和して軟膏を製造した。

本品は、日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして、更には外傷、火傷の治癒促進剤などとして有利に利用できる。

#### 実施例 B-9 注射剤

ムを製造した。

本品は、ビタミンC強化したサンドクリームで、口当り、溶け具合、風味とも良好である。

#### 実施例 B-6 錠剤

実施例A-3の方法で得た高純度2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸粉末20重量部に結晶性 $\beta$ -マルトース13重量部、コーンスターチ4重量部、ルチン1重量部及びリボフラビン0.5重量部を均一に混合した後、常法に従って打錠して、一錠150mgの錠剤を製造した。

本品は、ビタミンC、ビタミンP、ビタミンB<sub>2</sub>の複合ビタミン剤で、安定性もよく、飲み易い錠剤である。

#### 実施例 B-7 カプセル剤

酢酸カルシウム・一水塩10重量部、L-乳酸マグネシウム・三水塩50重量部、マルトース57重量部、実施例A-3の方法で得た $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸含有粉末20重量部及びエイコサペンタエン酸20%含有 $\gamma$ -シクロデキストリン包接化合物12重量部を均一に混合し、顆粒成形機にかけて顆

粒2(2)の方法で得た高純度 $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸粉末を水に溶解、中和し、常法に従って、精製濾過してバイロゲンフリーとし、この溶液を20mL容アンプルに $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸500mgになるように分注し、これを封入して注射剤を製造した。

本注射剤は、単体で、または、他のビタミン、ミネラルなどと混合して筋肉内又は静脈内に投与できる。また、本品は、低温貯蔵の必要もなく、安定な製剤である。

本品は、L-アスコルビン酸の場合と比較して、体内滞留時間が約2乃至10倍に延長され、徐々に加水分解を受け、L-アスコルビン酸を放出し、L-アスコルビン酸本来の生理効果を発揮する。

また、本品は、ビタミンC補給としてだけでなく、加水分解され抗酸化剤として活性酸素の除去、過酸化脂質の生成抑制などの効果を発揮し、ウイルス性疾患、細菌性疾患、外傷性疾患、免疫疾患、アレルギー疾患、糖尿病、白内障、循環器疾患、悪性腫瘍など各種疾患の予防剤、治療剤に有利に

利用できる。

#### 実施例 B-10 注射剤

塩化ナトリウム6重量部、塩化カリウム0.3重量部、塩化カルシウム0.2重量部、乳酸ナトリウム3.1重量部、マルトース48重量部及び実施例A-3の方法で得た高純度2-0- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸粉末2重量部を水1,000重量部に溶解し、常法に従って、精製濾過してバイロゲンフリーとし、この溶液を滅菌したプラスチック容器に250 mLずつ充填して注射剤を製造した。

本品は、ビタミンC補給としてだけでなく、カロリー補給、ミネラル補給剤としても利用され、更には、加水分解され、抗酸化剤として活性酸素の除去、過酸化脂質の生成抑制などの効果を発揮し、病中、病後の治療促進、回復促進、更には、ウイルス性疾患、細菌性疾患、外傷性疾患、免疫疾患、アレルギー疾患、糖尿病、白内障、循環器疾患、悪性腫瘍など各種疾患の予防剤、治療剤に有利に利用できる。

#### 実施例 B-11 経管栄養剤

浴用の湯に100乃至10,000倍に希釈して利用すればよい。本品は、入浴用の湯の場合と同様に、洗顔用水、化粧水などに希釈して利用することも有利に実施できる。

#### 実施例 B-13 乳液

ポリオキシエチレンベヘニルエーテル0.5重量部、テトラオレイン酸ポリオキシエチレンソルビトール1重量部、親油性モノステアリン酸グリセリン1重量部、ビルビン酸0.5重量部、ベヘニルアルコール0.5重量部、アボガド油1重量部、実施例A-3の方法で得た高純度2-0- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸粉末1重量部、ビタミンE及び防腐剤の適量を、常法に従って加熱溶解し、これにL-乳酸ナトリウム1重量部、1,3-ブチレングリコール5重量部、カルボキシビニルポリマー0.1重量部及び精製水85.3重量部を加え、ホモゲナイザーにかけ乳化し、更に香料の適量を加えて攪拌混合し乳液を製造した。

本品は、日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして有利に利用できる。

結晶性 $\alpha$ -マルトース20重量部、グリシン1.1重量部、グルタミン酸ナトリウム0.18重量部、食塩1.2重量部、クエン酸1重量部、乳酸カルシウム0.4重量部、炭酸マグネシウム0.1重量部、実施例A-5の方法で得た $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸含有粉末0.1重量部、チアミン0.01重量部及びリボフラビン0.01重量部からなる配合物を調製する。この配合物24gずつをラミネートアルミ製小袋に充填し、ヒートシールして経管栄養剤を調製した。

本経管栄養剤は、一袋を約300乃至500mLの水に溶解し、経管方法により鼻腔、胃、腸などへの経口的又は非経口的栄養補給液としても有利に利用できる。

#### 実施例 B-12 浴用剤

DL-乳酸ナトリウム21重量部、ビルビン酸ナトリウム8重量部、実施例A-1の方法で得た $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸含有粉末5重量部及びエタノール40重量部を、精製水26重量部及び着色料、香料の適量と混合し、浴用剤を製造した。

本品は、美肌剤、色白剤として好適であり、入

#### 実施例 B-14 クリーム

モノステアリン酸ポリオキシエチレングリコール2重量部、自己乳化型モノステアリン酸グリセリン5重量部、実施例A-3の方法で得た高純度2-0- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸粉末2重量部、流動パラフィン1重量部、トリオクタン酸グリセリル10重量部及び防腐剤の適量を、常法に従って加熱溶解し、これにL-乳酸2重量部、1,3-ブチレングリコール5重量部及び精製水66重量部を加え、ホモゲナイザーにかけ乳化し、更に香料の適量を加えて攪拌混合しクリームを製造した。

本品は、日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして有利に利用できる。

#### 〔発明の効果〕

本文で述べたごとく、本発明の新規物質 $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸は、直接還元性を示さず、安定性に優れ、しかも、生体内で容易に加水分解され、L-アスコルビン酸本来の抗酸化性、生理活性を発揮する。その上、 $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸は、生体内で生成され、代謝され



る物質でもあることが判明したことより、その安全性も極めて高い物質である。

また、 $\alpha$ -グリコシル- $\text{L}$ -アスコルビン酸が $\text{L}$ -アスコルビン酸と $\alpha$ -グルコシル糖化合物とを含有する溶液に糖転移酵素を作用させる生化学的手法により容易に生成できることより、経済性に優れ、その工業的实施も容易である。

更に、この直接還元性を示さない $\alpha$ -グリコシル- $\text{L}$ -アスコルビン酸は、安定性、生理活性も充分で、ビタミンC強化剤としてばかりでなく、安定剤、品質改良剤、抗酸化剤、生理活性剤、紫外線吸収剤などとして、飲料、加工食品、嗜好物などの飲食物、感受性疾患の予防剤、治療剤、更には美肌剤、色白剤など化粧品などに含有せしめて有利に利用できる。従って、本発明の $\alpha$ -グリコシル- $\text{L}$ -アスコルビン酸は広範な用途を有し、これら産業界に与える工業的意義は極めて大きい。

#### 4. 図面の簡単な説明

図は、本発明の $\alpha$ -D-グルコシル- $\text{L}$ -アスコルビン酸の赤外線吸収スペクトル図を示す。

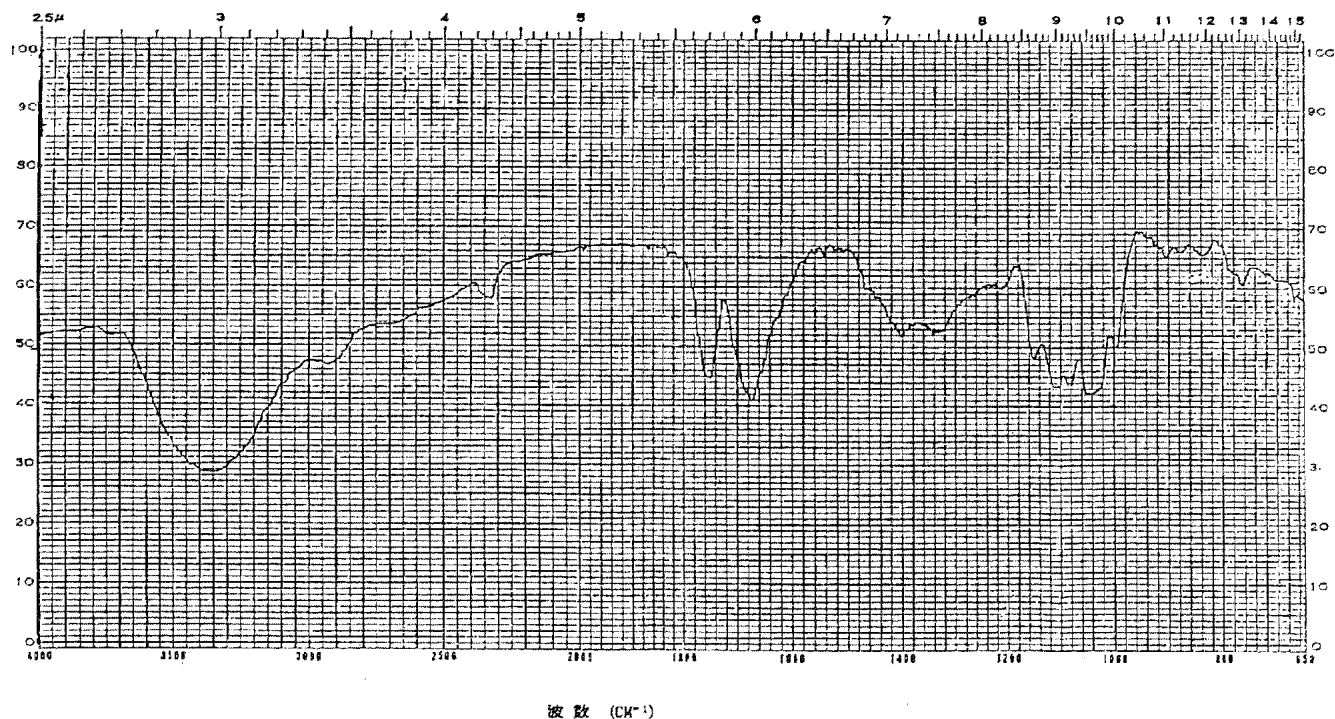
特許出願人

株式会社林原生物化学研究所

代表者 林 原 健

特許出願人

山 本



図

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成10年(1998)7月28日

【公開番号】特開平3-139288

【公開日】平成3年(1991)6月13日

【年通号数】公開特許公報3-1393

【出願番号】特願平1-274518

【国際特許分類第6版】

C12P 19/60

A23L 1/03

2/52

3/3562

A61K 7/00

C07H 15/26

【F1】

C12P 19/60

A23L 1/03

3/3562

A61K 7/00

F

X

C07H 15/26

A23L 2/00

F

特許出願書

平成8年6月17日

特許庁長官 南 川 祐 二 様



1. 事件の表示

平成1年特許願第274518号

2. 発明の名称

α-グリコシル-ル-アスコルビン酸とその製造方法並びに用途

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

岡山県岡山市下石井1丁目2番8号

株式会社味源生物化学研究所

代表者 林 良 樹

(他1名)

4. 補正の対象

明細書全文

5. 補正の内容

明細書全文を、別紙のように補正します。



明 細 書

1. 発明の名称

α-グリコシル-ル-アスコルビン酸とその製造方法並びに用途

2. 特許請求の範囲

- (1) 直接還元性を示さないα-グリコシル-ル-アスコルビン酸。
- (2) ル-アスコルビン酸とα-グルコシル糖化合物とを含有する糖転移酵素系を用い、直接還元性を示さないα-グリコシル-ル-アスコルビン酸を生産せしめ、これを採取することを特徴とする直接還元性を示さないα-グリコシル-ル-アスコルビン酸の製造方法。
- (3) 糖転移酵素がシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ(BC 2.4.1.19)またはα-グルコシダーゼ(BC 3.2.1.10)であることを特徴とする特許請求の範囲第(2)項記載の直接還元性を示さないα-グリコシル-ル-アスコルビン酸の製造方法。
- (4) 直接還元性を示さないα-グリコシル-ル-アスコルビン酸を含有せしめた組成物。
- (5) 薬品、食品、化粧品、医薬品、化粧品又は化粧品である特許請求の範囲第(4)項記載の組成物。
- (6) 組成物が、直接還元性を示さないα-グリコシル-ル-アスコルビン酸を0.001/100以上含有せしめたことを特徴とする特許請求の範囲第(4)又は(5)項記載の組成物。
- (7) 2-O-α-D-グルコシル-ル-アスコルビン酸。
- (8) 2-O-α-D-グルコシル-ル-アスコルビン酸が、ビタミンC強化剤、風味改善剤、安定剤、品質改良剤、抗酸化剤、生薬抽出剤、香料増強剤、染料又は着色剤である特許請求の範囲第(7)項記載の2-O-α-D-グルコシル-ル-アスコルビン酸。
- (9) ル-アスコルビン酸とα-グルコシル糖化合物とを含有する糖転移酵素系または糖転移酵素とグルコアミラーゼ(BC 3.2.1.8)とを用い、2-O-α-D-グルコシル-ル-アスコルビン酸を生産せしめ、これを採取することを特徴とする2-O-α-D-グルコシル-ル-アスコルビン酸の製造方法。
- (10) 糖転移酵素がシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ

(KC 2.4.1.12) または α-グルコシダーゼ (KC 3.2.1.20) であることを特徴とする特許請求の範囲第(9)項記載の2-O-α-D-グルコシル-L-アスコルビン酸の製造方法。

(11) L-アスコルビン酸と α-グルコシル糖化合物とを含有する溶液に糖転移酵素又は糖転移酵素とグルコミラーゼ (KC 3.2.1.3) とを作用させて得られる2-O-α-D-グルコシル-L-アスコルビン酸、L-アスコルビン酸およびD-グルコースを含有する溶液を、高速液体クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーから選ばれるクロマトグラフィーにかけ、この抽出液の2-O-α-D-グルコシル-L-アスコルビン酸含有割合を調製することを特徴とする2-O-α-D-グルコシル-L-アスコルビン酸の製造方法。

(12) 2-O-α-D-グルコシル-L-アスコルビン酸を含有せしめた組成物。

(13) 医薬物が、飲食物、栄養強化剤又は化粧品である特許請求の範囲第(12)項記載の組成物。

(14) 組成物が、2-O-α-D-グルコシル-L-アスコルビン酸を0.001%以上含有せしめたことを特徴とする特許請求の範囲第(12)又は(13)項記載の組成物。

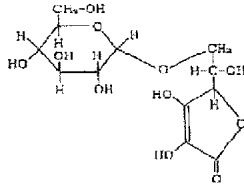
# 1. 発明の概要を要約

## 【産業上の利用分野】

本発明は、抗酸化性を示さない α-グリコシル-L-アスコルビン酸とその製造方法並びに用途に関し、更に詳細には、新規物質である直接還元性を示さない α-グリコシル-L-アスコルビン酸とその生化学的製造方法並びに α-グリコシル-L-アスコルビン酸を含有せしめた飲料、加工食品、嗜好物などの飲食物、感受性疾患の予防剤、応用するうちに抗感受性疾患および薬剤、色白剤などの化粧品など各種組成物への用途に関する。

L-アスコルビン酸を安定化させる方法として、L-アスコルビン酸の糖転移体が提案されている。例えば、先に本発明者等が、「ビタミン」第43巻、第206乃至209頁(1971年)、「ビタミン」第47巻、第259乃至261頁(1973年)および特公報48-38158号公報で、生化学的手法によるL-アスコルビン酸グルコシドの合成法を開示している。

しかしながら、これらのアスコルビン酸グルコシドは、いずれも同様の方法で精製され、得られたアスコルビン酸については、例えば、特公報第209頁(1971年)で、「得た精製体はアスコルビン酸の5倍の濃度の第1アルコール液がエーテル溶液によりグルコシドを形成したもの」と記載され、また、その生成がマルトースから α-グルコシル基の糖転移反応であること、更に、直接還元性を示す性質を有することなどから、その化学構造が、式(II)：



で示されるものであると考えられ、その安定性の程度についても、該公報実施例1の表の結果から明らかのように、L-アスコルビン酸よりは優れているものの、なお不安定であり、未だ実用化されるに至っていない。

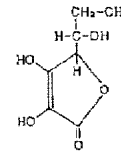
また、石戸等が特公報58-5923号公報で、有機化学的手法によるL-アスコルビン酸糖転移体の合成法を開示している。

しかしながら、このアスコルビン酸糖転移体は、特公報第7巻第6行乃至第8巻第11行で、2-O-β-D-(β-D-グルコピラノシル)-L-アスコルビン酸など21種類ものβ-D-グルコピラノシル糖のL-アスコルビン酸糖転移体を導いて説明していることから明らかなように、すべてのD-グルコースがβ結合し

## 【従来の技術】

L-アスコルビン酸は、

式(1)：



で示される化学構造を有しており、ヒト、サル、モルモットにとっては、生体内で合成できず、必須栄養素ビタミンCとなっている。

L-アスコルビン酸は、生体内で、例えば、生体配合組織の主要成分であるコラーゲンの合成に必要なプロリンやリジンのヒドロキシル化反応に関与し、また、例えば、ナトクロームCのFe<sup>+++</sup>を還元してFe<sup>++</sup>にするなどの酸化還元反応に関与し、更に、自由酸素による各種組織作用に関与するなどが知られており、生体の健康維持、増進に重要な役割をなしている。貧血病は、L-アスコルビン酸の欠乏症として占くから加われ、皮膚の硬化化、血球出血、歯状出血、貧血や骨質低下症などを発する。これを予防し、健康を維持するために、L-アスコルビン酸の推奨(口摂取量(RDA))が定められ、それによれば我が国では、成人男子95mg、成人女子50mgとされている。

L-アスコルビン酸の用途は、単に必須栄養素としてのビタミンC強化剤にとどまらず、その化学構造、生体作用から、例えば、利尿剤、利尿剤、酸化防止剤、漂白剤、安定剤などとして各種化学反応基材、配合剤などに、また、ウイルス性疾患、細菌性疾患、風湿性疾患など感受性疾患の予防剤、治療剤すなわち抗感受性疾患剤に、更に、還元剤、紫外線吸収剤、メラニン生成抑制剤などの発色剤、色白剤などとして化粧品にまで及び、その用途は極めて広い。

L-アスコルビン酸の最大の欠点は、それが直接還元性を示すため、極めて不安定で、酸化分解を受け易く、容易にその生理活性を失うことである。

ているL-アスコルビン酸糖転移体である。

また、本発明者が特開昭58-19348号公報で有機化学的手法によるL-アスコルビン酸糖転移体の合成法を開示しているが、これもα-グルコシル基のL-アスコルビン酸糖転移体である。

また、これらα-グルコピラノシル基のL-アスコルビン酸糖転移体について、本発明者等が検討したところ、生体、とりわけ、ヒトにおいて、生体活性を充分發揮させることの困難なことが判明した。更に、その有機化学的手法による合成物は、反応が複雑で収率が低く、それ故に、経費が著しく加えて、その糖転移体の純度、安全性を確保する上において、相当の困難が伴う欠点のあることが判明した。

以上のように、従来知られているL-アスコルビン酸糖転移体は、安定性、安全性、生体活性、経費性などの点で、いずれも不十分であり、その改良を見るに至っていない。

## 【発明が解決しようとする課題】

従来のL-アスコルビン酸糖転移体の欠点を解消し、安定性に優れ、生体内でL-アスコルビン酸の生体活性を充分發揮し、しかも無害で安心して利用できるL-アスコルビン酸糖転移体の実現が強く望まれている。

## 【課題を解決するための手段】

本発明は、従来のL-アスコルビン酸糖転移体の欠点を解消するためになされたものであって、とりわけ、生化学的手法による糖転移反応を利用し、新しいL-アスコルビン酸糖転移体を見出して鋭意研究を続けてきた。

その結果、直接還元性を示す、安定性に優れ、しかも生体内で容易に加水分解され、生体活性の点でも申し分のない新規なL-アスコルビン酸糖転移体を見出し、更に、その製造方法を確立し、得てこの新規なL-アスコルビン酸糖転移体を含有せしめた飲食物、栄養強化剤、化粧品など各種組成物への用途を確立して本発明を完成した。

また、本発明のα-グリコシル-L-アスコルビン酸が、L-アスコルビン酸とα-グルコシル糖化合物とを容易に反応することにより、生体内で生成され、代謝される性質であることが判明したことにより、本発明のα-グリコシル-L-アスコルビン酸は、本来、生体内物質であり、安全性の上からも極めて安全

ーアスコルビン酸の新規な精製法を言うことができる。

ちなみに、有機化学的手法によって合成されるβ-D-グルコシル糖のL-アスコルビン酸糖誘導体は、生体内で生成されず、従って、体外にとっては異物と考えられる。

本発明のα-グリコシル-L-アスコルビン酸はその製造を問わず、生化学的手法による製造であっても、有機化学的手法による製造であってもよい。

しかし、一般的には、安全性、経済性の上から、L-アスコルビン酸とα-グルコシル糖化合物とを含有する溶液に糖転移酵素を作用させる生化学的手法により生成させるのが望ましい。

本発明でいう直接還元性を示さないとは、L-アスコルビン酸の場合とは違って、そのままで、2,6-ジクロロフェノールインドフェノールを還元脱色しないことを意味する。

本明お告でいうL-アスコルビン酸とは、特に不重合が生じない限り、遊離のL-アスコルビン酸のみならず、L-アスコルビン酸のアルカリ金属塩若しくはアルカリ土類金属塩などのL-アスコルビン酸塩、または、それらの塩分解を意味する。従って、本発明の糖転移反応に用いるL-アスコルビン酸としては、通常、遊離のL-アスコルビン酸だけでなく、必要に応じて、L-アスコルビン酸ナトリウム、L-アスコルビン酸カルシウムなどが適宜用いられる。

また同時に、本発明でいうα-グリコシル-L-アスコルビン酸、β-D-α-グリコシル-L-アスコルビン酸などについても、特に不重合が生じない限り、遊離の酸のみならず、それらの塩をも意味する。

本発明で用いるα-グルコシル糖化合物は、同時に用いる糖転移酵素によってL-アスコルビン酸から直接還元性を示さないα-グリコシル-L-アスコルビン酸を生成できるものであればよく、例えば、マルトース、マルトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオース、マルトオクタオースなどのマルトオリゴ糖、デキストリン、シクロデキストリン、アミロースなどの澱粉部分加水分解物、更には、糖化澱粉、糊化澱粉、糖化澱粉などが適宜選択できる。

従って、α-グリコシル-L-アスコルビン酸の生成を容易にするためには、糖転移酵素に好適なα-グルコシル糖化合物が選ばれる。

ばれる。

また、固定化された糖転移酵素をバッチ式で繰り返し、または連続式で反応に利用することも有利に実施できる。

本発明の反応方法は、通常、前述のL-アスコルビン酸とα-グルコシル糖化合物とを含有する溶液に糖転移酵素を加え、該酵素が充分作用する条件、通常、pH約3乃至9、温度約10乃至80°Cの範囲から選ばれた条件に維持して行う。また、反応中にL-アスコルビン酸が酸化分解を受けやすいので、できるだけ低気または還元状態で遮光下に維持するのが望ましく、必要ならば、酸素除去、窒素置換などを併行させて反応させることも有利に実施できる。

また、必要ならば、糖転移反応性を有する糖単体の増強中に、L-アスコルビン酸とα-グルコシル糖化合物とを共存させて、その目的物質を生成させることも有利に実施できる。

本発明の直接還元性を示さないα-グリコシル-L-アスコルビン酸について述べると、L-アスコルビン酸の少なくとも1位の炭素のアルコール基にα-D-グルコシル基が結合し、その結合数は、1乃至7個程度のグルコシル基がα-1,4結合しており、その首々の物質としては、例えば、2-D-α-D-グルコシル-L-アスコルビン酸、2-D-α-D-マルトシル-L-アスコルビン酸、1-D-α-D-マルトトリオシル-L-アスコルビン酸、2-D-α-D-マルトテトラオシル-L-アスコルビン酸、2-D-α-D-マルトペンタオシル-L-アスコルビン酸、2-D-α-D-マルトヘキサオシル-L-アスコルビン酸、2-D-α-D-マルトヘプタオシル-L-アスコルビン酸などである。α-グルコシダーゼによって生成させる場合には、通常、2-D-α-D-グルコシル-L-アスコルビン酸だけを生成させることができるし、必要により、2-D-α-D-グルコシル-L-アスコルビン酸に、2-D-α-D-マルトシル-L-アスコルビン酸、2-D-α-D-マルトトリオシル-L-アスコルビン酸などを添加して生成させることもできる。

シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼのα-アミラーゼによって生成させる場合には、一般に、α-グルコシダーゼの場合と異なるα-D-グルコシル糖の結合数の大きいものまで混在生成させることができ、使用するα-グルコシル糖化合物によっても変化するが、一般的には、シクロマルト

例えば、糖転移酵素として、α-グルコシダーゼ(EC 3.2.1.23)を用いる際には、マルトース、マルトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオース、マルトオクタオースなどのマルトオリゴ糖、または、DE約5乃至50のデキストリン、澱粉部分加水分解物などが好適であり、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ(EC 3.4.1.18)を用いる際には、シクロデキストリンまたはDE1未満の糖化澱粉からDE約10のデキストリンまでの澱粉部分加水分解物などが好適であり、α-アミラーゼ(EC 3.2.1.1)を用いる際には、DE1未満の糊化澱粉からDE約30のデキストリンまでの澱粉部分加水分解物などが好適である。

反応時のL-アスコルビン酸の濃度は、通常、1%以上、望ましくは、約2%至30%以上含有してあればよく、α-グルコシル糖化合物の濃度は、L-アスコルビン酸に対して、通常、約0.5乃至30倍の範囲が好適である。

本発明に用いる糖転移酵素は、L-アスコルビン酸とこの酵素に好適なα-グルコシル糖化合物とを含有する溶液に作用させる時、L-アスコルビン酸を分解せずに、L-アスコルビン酸の少なくとも2位の炭素のアルコール基にα-グルコシル基を1乃至数個転移してα-グリコシル-L-アスコルビン酸を生成させるものであればよい。

例えば、α-グルコシダーゼは、マウスの腎臓、ラットの肝臓、イタ、ブタの小腸など動物由来の酵素、コムギ子、トウモロコシ胚芽など植物由来の酵素、更には、ムコール(Mucor)属、ペニシリウム(Penicillium)属などに属するカビ、またはサッカロミセス(Saccharomyces)属などに属する酵母などの微生物を培養増殖で増殖し得られる培養由来の酵素が、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼは、バチルス(Bacillus)属、クレブネラ(Klebsiella)属などに属する細菌培養物由来の酵素が、α-アミラーゼは、バチルス属などに属する細菌培養物由来の酵素などが適宜選択できる。

これらの糖転移酵素は、前記の条件を満足しさえすれば、必ずしも増殖して使用する必要はなく、通常は、懸濁液で本発明の目的を達成することができる。必要ならば、公知の各種方法で精製して使用してもよい。また、市販の糖転移酵素を利用することもできる。使用後食塩と反応時間とは、懸液の調製があり、通常は、懸液の点から約5乃至60時間で反応を停止するように調整量で選

アヤストリン・グルカノトランスフェラーゼの場合には、α-D-グルコシル基の数が1乃至7程度まで分布し、α-アミラーゼの場合には、これよりその分布がやや狭い程度である。このような混合物である生成物を、必要によって、α-アミラーゼ(EC 3.2.1.1)、β-アミラーゼ(EC 3.2.1.2)、グルコアミラーゼ(EC 3.2.1.3)などによって、澱粉加水分解し、そのα-D-グルコシル基の数を低減させることができる。例えば、グルコアミラーゼを作用させる場合には、2-D-α-D-マルトシル-L-アスコルビン酸以上の高分子物を加水分解し、2-D-α-D-グルコシル-L-アスコルビン酸を管理生成させることができる。また、β-アミラーゼを作用させる場合には、主に、2-D-α-D-マルトトリオシル-L-アスコルビン酸以上の高分子物を加水分解し、2-D-α-D-グルコシル-L-アスコルビン酸および2-D-α-D-マルトシル-L-アスコルビン酸の混合物を管理生成させることができる。

以上述べたように、各種方法により生成せしめた直接還元性を示さないα-グリコシル-L-アスコルビン酸含有溶液は、一般に、α-グリコシル-L-アスコルビン酸のみならず、未反応のL-アスコルビン酸、α-グルコシル糖化合物などを含有しているけれども、そのままで、α-グリコシル-L-アスコルビン酸含有製品にすることができる。通常は、反応液を加熱するなどで酵素を失活させ、過濾、濃縮してシラップ状の、更には、乾燥、粉末化して粉末状のα-グリコシル-L-アスコルビン酸含有製品にする。

更に、精製されたα-グリコシル-L-アスコルビン酸製品を製造する場合には、α-グリコシル-L-アスコルビン酸と未反応のL-アスコルビン酸、D-グルコース、α-グルコシル糖化合物などからなる混合物との分子間、類物主などの違いを利用する分離手段、例えば、膜分離、カラムクロマトグラフィー、薄層板クロマトグラフィー、ゲル浸透クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどの方法で分離精製すれば、高純度の製品を得ることから容易に達成することができる。この際、分離されるL-アスコルビン酸、α-グルコシル糖化合物などを、再度、糖転移反応の原料として用いることも有利に実施できる。また、糖転移反応終了後、クロマトグラフィーなどの分離手段にかけるまでの間に、必要ならば、例えば、反応液を加熱して生じる不溶物を濾過して除去したり、塩析処理などで処理して反応液中の目的性物質、着色物質などを



スコルビン酸の約50%が酸解離状態に存在していた。

### (3) 増製

(1) の反応停止直後、Bio-Rad社製のゲル透過層 (商品名 Bio-Gel P-2) を用いて、水を溶出液としてゲル透過クロマトグラフィーを行い、 $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸の含有割合を測定し、次いで会社製作所製のカラム (商品名 Shit-pack DBS) を用いて、0.3%TBAを溶出液として高価液体クロマトグラフィーを行い、 $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸含有割合を測定し、減圧濃縮し、凍結乾燥し粉末化して、純度99.9%の高純度 $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸を得る。反応液中の $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸に対して、収率約90%であった。

### (3) 物化学的性質

本発明の $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸の代表例として、(2)で調製した高純度 $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸を用いて、次に示す物化学的性質を調べた。

なお、 $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸よりも $\alpha$ -D-グルコシル糖の糖の大きいものの例として、後に述べる実施例4-1の方法で得た $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸を用いて、できるだけ範囲内で調べ、その性質をカッコ内 [ ] に示した。

・元素分析:  $C_{17}H_{19}O_{11}$  として

理論値  $C=42.5\%$   $H=5.36\%$

実測値  $C=42.3\%$   $H=5.38\%$

$N=0.01\%$

・分子量: 質量分析装置 (日立製作所製、JMS-805) を用いてPMマススペクトルを測定した結果、 $(M+H)^+(C_{17}H_{19}O_{11})$  ( $M=339$ ) として339が検出された。

・紫外吸収スペクトル:  $\lambda_{max}$  263nmに、 $\epsilon$  2.0で5590に吸収極大を示す。

【本性質と実質的に同一の性質を示す。】

・赤外線吸収スペクトル: IR分光法で測定した。

結果は、図に示す。

成した。

これらNMR、解離定数、メチル化分析のデータから、L-アスコルビン酸の2位の炭素のアルコール基がエーテル基によりD-グルコースと $\alpha$ -グルコノド結合を形成しているものと判断される。

・溶剤に対する溶解性: 水、0.1N-カセイソーダ、0.1N-酢酸に易溶、メタノール、エタノールに難溶、エーテル、ベンゼン、クロロホルム、酢酸ニトリに不溶。

【本性質と実質的に同一の性質を示す。】

・発色反応: 直接還元性を示さず、2,6-ジクロロフェノールインドフェノールを還元発色しない。2,4-ジニトロフェニルピロリジン反応を示さない。アントロン試薬反応で発色を示す。

【本性質と実質的に同一の性質を示す。】

・安定性:

(a)  $\alpha$ -D-グルコシダーゼ作用または1N-塩酸、100℃、5分間処理により加水分解され、L-アスコルビン酸とD-グルコースとをモル比1:1で生成する。

【グルコアミラーゼにより加水分解され、2-D- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸とD-グルコースとを生成する。】

(b) D-グルコシダーゼによって加水分解されない。

【本性質と実質的に同一の性質を示す。】

(c) 1-D- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸と、特公40-88155号公報に開示されているD-0- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸およびL-アスコルビン酸との水溶液中の安定性を比較した。すなわち、それぞれの試料を濃度70 $\mu$ M、pH7.0またはpH2.0に調整して吸光度計用セルに盛り、これを20℃に維持して定期的に吸光度50%によりpH7.0の場合250nm、pH2.0の場合245nmで吸光度を測定し、その減衰率(%)を測定し比較した。結果を次表に示す。

【本性質と実質的に同一の性質を示す。】

・NMR: NMR測定装置 (日本電子製、JNM-GX400) を用いて測定した。

測定溶液は清水を用い、測定時の溶液のpHは2.8であった。

内部標準としてTSP (sodium 3-trimethylsilylpropionate-2, 2, 3, 3-d<sub>4</sub>) を用いた。

<sup>1</sup>H-NMR  $\delta$  ppm (D<sub>2</sub>O)

3.50 (1H, dd, J=9.5, J=1.7 Hz)

3.56 (1H, dd, J=8.4, J=1.5 Hz)

3.75 (2H, d, J=6.4 Hz)

3.78 (2H, d, J=3.0 Hz)

3.85 (1H, dd, J=6.5, J=9.1 Hz)

4.02 (1H, dt, J=8.7, J=3.1 Hz)

4.38 (1H, td, J=6.4, J=1.1 Hz)

4.81 (1H, d, J=1.5 Hz)

5.52 (1H, d, J=3.4 Hz)

・解離定数: pKa=2.0

この値を、ゼイ・ゼルノウ (J. Jarnow) 博士、テトラヘドロン (Tetrahedron) 第25巻、第1482乃至1486頁 (1979年) の第1表およびパオウェン・ルー (Pao-Pan Lu) 博士、ジャーナル・オブ・アグリカルチュラル・フィード・ケミストリー (Journal of Agricultural Food Chemistry) 第22巻、第21乃至26頁 (1974年) の第2表に示される各種アスコルビン酸誘導体の解離定数(pKa)を参照すると、本物質の場合には、そのアスコルビン酸部分の2位のアルコール基が $\alpha$ -D-グルコシル結合に結合し、2位のアルコール基は遊離のままであると判断される。

・メチル化分析

前述のパオウェン・ルー (Pao-Pan Lu) 等の文献に記載されているL-アスコルビン酸をジアゾメタンによりメチル化して主に3-O-メチル-L-アスコルビン酸を生成するメチル化反応の方法により、本物質をメチル化し、次いで、得られるメチル化物を加水分解して分析したところ、主として、3-O-メチル-L-アスコルビン酸とD-グルコースとを生成

表

pH	時間 (h)	0	0.25	0.5	1.0	21.0
	24h	100%	100%	100%	100%	100%
7.0	60h	100%	95%	98%	100%	98%
	24h	100%	47%	20%	8%	2%
2.0	24h	100%	100%	100%	100%	100%
	60h	100%	95%	98%	95%	95%
	24h	100%	95%	97%	87%	19%

(注) 24h/1h、未発明の2-D- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸を意味し、60h/1hは、対照のD-0- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸を意味し、24hは、対照のL-アスコルビン酸を意味する。

表の結果から明らかにように、2-D- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸は、D-0- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸、L-アスコルビン酸のいずれとも違って、水溶液中で安定である。

【2-D- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸の性質と実質的に同一の性質を示す。】

・生体活性

(a) ナトリウムC還元活性

2-D- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸と、D-0- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸およびL-アスコルビン酸を用いて、ナトリウムCの還元活性を比較した。

すなわち、0.14リットル容量の容量瓶 (pH7.8) 0.2mM EDTA 0.06M、0.1mMナトリウムC 0.1mL、一定量の水を加えて総容量1mLとし、これにそれぞれの試料10mLを含む10 $\mu$ Lを加え、室温にて550nmにおける吸光度の測定を分光光度計にて測定し比較した。還元活性は、反応初速度より吸光度 (a.u.) / 分 / 10 $\mu$ Lを求め算出した。

その結果、2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸は、5-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸、L-アスコルビン酸のいずれとも違って、還元性を示さないことが判明した。

なお、2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸は、実験1の方法で調製した $\alpha$ -グルコシダーゼ試薬により加水分解されると、この還元性を示すことが判明した。

#### (b) コラーゲン合成活性

2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸と、4-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸およびL-アスコルビン酸を用いて、コラーゲン合成活性を調べた。

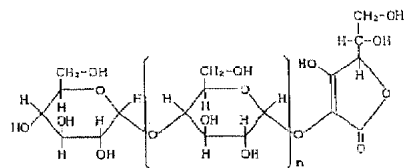
すなわち、イーグルEDF (10%FBS含む) 培養液中でヒトの線維芽細胞 (7×10<sup>4</sup>細胞/プレート) を1週間培養し、これに4 $\beta$ -プロリンを相当量4 $\mu$ M、 $\beta$ -アミノアロピオニトリルを相当量20 $\mu$ Mおよびそれらの試料を0.2mMになるように加え、更に、24時間培養した。これに10%FBSトリチロ酸を加え、培養液中のコラーゲン成分を回収し、凍結乾燥した。この試料を溶解し、r8を調製後、27℃、30分間コラゲナーゼ (30 $\mu$ g) 処理を行ない、過剰分画し、この上層に含まれる炭水化物を測定しコラーゲン合成活性を求めた。

その結果、2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸は、アスコルビン酸と同等のコラーゲン合成活性を示していることが判明した。

なお、5-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸のコラーゲン合成活性は、これらよりやや劣る傾向にあった。

以上の理化分析結果から、本実験で調製した直接還元性を示さない $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸は、

式[III]：

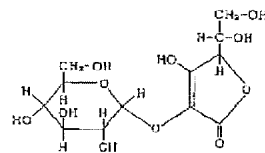


ただし、nは0または1の整数から選ばれる数値

で示される化学構造を有している。

また、その代表例としての2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸は、

式[IV]：



で示される化学構造を有している。

実験5 生体内での効果

ラットに、L-アスコルビン酸1gとマルトース500mg (10%/15g、5mL) とを経口投与し、経時的に採血し、离心分離し、その上清 (血漿) を用いて、高速電

泳クロマトグラフィーで分離したところ、 $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸および少量の $\alpha$ -D-マルトシル-L-アスコルビン酸に相当するピークは、検口反毎秒3分頃から認められ、180分では最高に達し、その後、急激に減少し、360分で血漿中から消失した。

このピークのうち、大部分を占める $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸を示す物質を単離し、詳細に調べたところ、前述の2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸の理化学的性質と同一であることが判明した。

従って、 $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸は、生体内で生成され、代謝され、関与する生体物質であることから、その安全性は極めて高いものであると言える。

#### 実験4 急性毒性テスト

7週令の3d系マウスを使用して、実験2(2)の方法で調製した高純度 $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸製品を経口投与して急性毒性テストをしたところ、体重1kg当たり5gまで死亡例は見られなかった。

従って、本物質の毒性は極めて低い。

なお、特に述べる実験例A-1の方法で製造した $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸を用いて本テストを行ったところ、同様の結果を得られ、重複の極めて低いことが判明した。

以下、本発明の実施例として、直接還元性を示さない $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸の製造例を実施例Aで、その $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸の各種製剤への用途例を実施例Bで述べる。

#### 実施例 A-1 $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸

$\alpha$ -シクロデキストリン9重量部を水35重量部に加熱溶解し、還元下に置いて、L-アスコルビン酸3重量部を加え、pH5.5、60℃に維持しつつ、これに、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ (株式会社住友化学工業研究所製) を $\alpha$ -シクロデキストリン100単位あたり150単位加えて4時間反応させた。反応液を減圧旋光クロマトグラフィー (島津製作所製、LC-8; カラム、 $\mu$ -IC AQ300 005; 溶剤組成、0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-0.1% NaPO<sub>4</sub> (pH2.0); 流速、0.5mL/min; 検出、日本分光工業製、SPU-T-340) で分析したところ、L-アスコルビン酸が9.5分の位置に現れたのに対し、新たに生成した $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸

が11.2分、 $\alpha$ -D-マルトシル-L-アスコルビン酸が15.7分、 $\alpha$ -D-マルトリオシル-L-アスコルビン酸が20.8分、 $\alpha$ -D-マルトテトラオシル-L-アスコルビン酸が24.9分、 $\alpha$ -D-マルトペンタオシル-L-アスコルビン酸が28.1分、 $\alpha$ -D-マルトヘキサオシル-L-アスコルビン酸が32.1分および $\alpha$ -D-マルトヘptaオシル-L-アスコルビン酸が33.6分の位置に現れた。L-アスコルビン酸の約50%がこれら $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸へ変換していた。本反応液を加熱して非還元を失活させ、濃縮し、濃縮液を実験2(2)の方法で準じて $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸や各成分を詳細単離し、混合して各成分を含有した $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸を単離し、これを凍干乾燥、粉末化して $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸の原料製品を、原料輸送用、原料のL-アスコルビン酸に対して約90%/1%の収率で得た。

本製品は、直接還元性を示さず、安定性、生体活性も充分で、ビタミンC製剤としてばかりでなく、安定剤、品質改良剤、抗酸化剤、生体活性剤、粉体分散剤などとして、食品、抗酸化剤、化粧品など、各種化粧品への用途に有利に利用できる。

#### 実施例 A-2 $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸

アキストリン (05約6) 40重量部を水50重量部に加熱溶解し、還元下に置いて、L-アスコルビン酸15重量部を加え、pH5.5、65℃に維持しつつ、これに、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼをデキストリン100単位あたり570単位加えて、40時間反応させた。反応液を、実施例A-1と同様に高濃度液クロマトグラフィーで分析したところ、L-アスコルビン酸の約50%が、実施例A-1と同様に、 $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸、 $\alpha$ -D-マルトシル-L-アスコルビン酸、 $\alpha$ -D-マルトリオシル-L-アスコルビン酸、 $\alpha$ -D-マルトテトラオシル-L-アスコルビン酸、 $\alpha$ -D-マルトペンタオシル-L-アスコルビン酸、 $\alpha$ -D-マルトヘキサオシル-L-アスコルビン酸などの $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸に変換していた。反応液を加熱し非還元を失活させ、濃縮し、濃縮液を常法により活性炭で脱色精製し、濃縮して、シフアップ状の $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸を含有する $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸製品を固形物当り原料重量に対して約80%/1%で得た。

本製品は、それに含まれる $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸が直接還元性を

示す。安定性、生理活性も充分で、ビタミンC酸化剤としてばかりでなく、調味料、保藏剤、安定剤、品質改良剤、抗酸剤、生理活性剤、紫外線吸収剤などとして、軟食物、抗感受性疾患剤、化粧品など、各種組成物への用途に有利に利用できる。

実施例 4-1 2-0-α-D-グルコシル-L-アスコルビン酸

実施例4-2の方法に準じて調製したシラップ状のα-グルコシル酸化化合物を含有するα-グリコシル-L-アスコルビン酸製品10重量部を水4重量部に溶解し、これにグルコプエリーゼ(EG 3,2,1,3、東洋紡製株式会社販売)を該製品固形物グラム当り100単位加え、50℃、5時間反応させた。反応液を高濃度液体クロマトグラフィーで分析したところ、主成分を含有していたα-グリコシル-L-アスコルビン酸は、2-0-α-D-グルコシル-L-アスコルビン酸に変換していた。

反応液を加熱して酵素を失活させ、蒸留し、濃度を実験2(2)の方法に準じて精製し、2-0-α-D-グルコシル-L-アスコルビン酸含有割合を測定し、減圧濃縮し、粉末化して、純度99.0%以上の高純度2-0-α-D-グルコシル-L-アスコルビン酸を原料のL-アスコルビン酸に対して約60%/%の収率で得た。

本品の理化学的性質を調べたところ、実験2(3)で示す2-0-α-D-グルコシル-L-アスコルビン酸と実験的に同一であった。

本2-0-α-D-グルコシル-L-アスコルビン酸は、還元剤性を示さず、安定性、生理活性も充分で、ビタミンC酸化剤として、安定剤、品質改良剤、抗酸剤、生理活性剤、紫外線吸収剤、化粧品、医薬原料などとして、軟食物、抗感受性疾患剤、化粧品など、各種組成物への用途に有利に利用できる。

実施例 4-1 α-グリコシル-L-アスコルビン酸

デキストリン(3618)20重量部を水70重量部に加熱溶解し、還元下において、これにL-アスコルビン酸10重量部と実験1の方法で調製した部分精製α-グリコシダーゼをデキストリングラム当り4単位加え、減圧下、pH5.5、50℃で3時間反応させた。次いで実施例4-2の方法に準じて精製し、濃縮した後、粉末化して粉状の製品を収率約50%/%で得た。

本品は、約10%/%のα-グリコシル-L-アスコルビン酸を含有していた。

これを濃縮し、固定化α-グリコシダーゼ製品を回収し、再利用に回した。

得られる凝縮を加熱し、実施例4-2の方法に準じて型押し、濃縮した後、粉末化して、粉状の製品を収率約95%/%で得た。

本品は、約7%/%のα-グリコシル-L-アスコルビン酸を含有していた。

本品は、それに含まれるα-グリコシル-L-アスコルビン酸が還元剤性を示さず、安定性、生理活性も充分で、ビタミンC酸化剤としてばかりでなく、甘味料、調味料、保藏剤、安定剤、品質改良剤、抗酸剤、生理活性剤、紫外線吸収剤などとして、軟食物、抗感受性疾患剤、化粧品など、各種組成物への用途に有利に利用できる。

実施例 5-1 チューインガム

ガムベース25重量部及び実施例4-4の方法で得たα-グリコシル-L-アスコルビン酸含有粉末20重量部とを60℃でミキサーにより溶解し、次いで、水不溶性マルチール(林研商事株式会社販売、登録商標マビット)50重量部、リン酸カルシウム1.5重量部及びレシチンモノステアロキドロデキストリン包埋化合物0.1重量部を混合し、最終に調味料少量を混合して十分に混練し、ロール加工、成形してチューインガムを得た。本品は、ビタミンCを酸化したチューインガムであって、しかも低酸酸性、低カロリーである。

実施例 5-2 凍菓

イチゴ果糖15重量部に水1.2重量部を混合し、加熱溶化しつつ、これに砂糖1.5重量部、糖結晶D-マルトース(林研株式会社製造、登録商標サンマルト)1.7重量部及び実施例4-2の方法で得たα-グリコシル-L-アスコルビン酸含有シラップ0.5重量部を混合し、以後、常法に従って、成形、包装して凍菓を製造した。

本品は、ビタミンCを酸化した凍菓で、着色が初製され日時よく、口当たり、風味良好なびんぐで風物菓子である。

実施例 5-3 混合甘味料

ほうみつ10重量部、異性化糖50重量部、果糖20重量部及び実施例4-3の方法で得た高純度2-0-α-D-グルコシル-L-アスコルビン酸粉末1重量部を混合して混合甘味料を得た。

本品は、ビタミンCを酸化した甘味料で、軟硬食品として好適である。

本品は、それに含まれるα-グリコシル-L-アスコルビン酸が還元剤性を示さず、安定性、抗酸剤、生理活性も充分で、ビタミンC酸化剤としてばかりでなく、調味料、保藏剤、安定剤、品質改良剤、抗酸剤、生理活性剤、紫外線吸収剤などとして、軟食物、抗感受性疾患剤、化粧品など、各種組成物への用途に有利に利用できる。

実施例 4-5 α-グリコシル-L-アスコルビン酸

マルトース10重量部を水80重量部に加熱溶解し、還元下において、これにL-アスコルビン酸10重量部とシグマ化学工業の種子由来のα-グリコシダーゼをマルトースグラム当り4単位加え、減圧下、pH5.0、50℃で3時間反応させた。次いで実施例4-2の方法に準じて精製し、濃縮した後、粉末化して、粉状の製品を収率約90%/%で得た。本品は、約15%のα-グリコシル-L-アスコルビン酸を含有していた。

本品は、それに含まれるα-グリコシル-L-アスコルビン酸が還元剤性を示さず、安定性、生理活性も充分で、ビタミンC酸化剤ばかりでなく、甘味料、調味料、保藏剤、安定剤、品質改良剤、抗酸剤、生理活性剤、紫外線吸収剤などとして、軟食物、抗感受性疾患剤、化粧品など、各種組成物への用途に有利に利用できる。

実施例 4-6 α-グリコシル-L-アスコルビン酸

(1) α-グリコシダーゼ菌液の調製

マルトース4%/%, リン酸1カリウム0.1%/%, 硝酸アンモニウム0.1%/%, 硫酸マグネシウム0.05%/%, 酸化カリウム0.05%/%, ポリペプトン0.2%/%, 炭酸カルシウム1%/%(例に於て菌液に添加する際に調整液に添加)および赤いなる液体培地にムコール・ジャバニカス(Mucor javanicus) IFD 4576を温度30℃で4時間無酸素培養した。培養終了後、菌液を採取し、高純度α-グルコシダーゼ製品とした。

(2) α-グリコシル-L-アスコルビン酸の製造

マルトース(林研株式会社、登録商標サンマルト)40重量部を水70重量部に加熱溶解し、還元下において、これにL-アスコルビン酸10重量部と(1)の方法で調製した固定化α-グリコシダーゼ製品をマルトースグラム当り10単位加え、減圧下、pH5.5、50℃で3時間反応させた。

実施例 5-4 チョコレート

カカオペースト40重量部、カカオバター15重量部、飴水結晶マルチール50重量部及び実施例4-1の方法で得たα-グリコシル-L-アスコルビン酸含有粉末1重量部を混合してシファイナーに通して粘度を下げた後、コンチェに入れて50℃で2昼夜練り上げる。この間にレシチン0.5重量部を添加して充分に分散させた。次いで温度調整器で21℃に冷却し、バターの固まる範囲に準じて流し込み、調整器でアワ抜きを行った後、10℃の冷却シリンダーを20分間で通過させて固化させた。これを型抜きして包封し製品を得た。

本品は、酸味性がなく、色、光沢共に良く、内部組織も良好であり、口中でなめらかに溶け、上品な甘味とよくなめらかである。また、本品は、ビタミンCを酸化したチョコレートであって、低カロリー、低酸酸性である。

実施例 5-5 サンドクリーム

結晶性D-マルトース(林研株式会社製造、登録商標ファイントース)1.20重量部、ショートニング1.30重量部、実施例4-4の方法で得たα-グリコシル-L-アスコルビン酸含有粉末10重量部、レシチン1重量部、レシニオイル1重量部、パニラオイル1重量部を常法により攪拌してサンドクリームを製造した。

本品は、ビタミンCを酸化したサンドクリームで、口当たり、解け具合、風味とも良好である。

実施例 5-6 飲料

実施例4-3の方法で得た高純度2-0-α-D-グルコシル-L-アスコルビン酸粉末10重量部に結晶性D-マルトース15重量部、コーンスターチ4重量部、ルチン1重量部及びリボフラビン0.5重量部を均一に混合した後、常法に従って打錠して、一般150mlの瓶用を製造した。

本品は、ビタミンC、ビタミンB、ビタミンB<sub>12</sub>の複合ビタミン剤で、安定性もよく、飲み易い飲料である。

実施例 5-7 カプセル剤

酢酸カルシウム、水増10重量部、L-乳酸マグネシウム、三水塩50重量部、マルトース57重量部、実施例4-3の方法で得たα-グリコシル-L-アスコルビン酸含有粉末20重量部及びニコチンペンタエーゼン2%含有α-シクロデキストリン塩基を含有10重量部を均一に混合し、順次成形機にかけて顆粒とした後、常



錠に包んで、ゼラチンカプセルに封入して、一カプセル150mgのカプセル剤を製造した。

本品は、血中コレステロール低下剤、免疫賦活剤、抗がん剤などとして、感染症の予防剤、治療剤、健康増進用食品などとして有利に利用できる。

#### 実施例 8-8 混合

酢酸ナトリウム・三水塩1重量部、DL-乳酸カルシウム4重量部をグリセリン10重量部と列一に混合し、この混合物を、ワセリン50重量部、本例10重量部、ラノリン10重量部、ゴマ油14.5重量部、実施例A-4の方法で得た $\alpha$ -グルコシル- $\beta$ -アスコルビン酸含有粉末1重量部及びハッカ油0.5重量部の混合物に加えて、更に列一に混和して軟膏を製造した。

本品は、日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして、更には外傷、火傷の治癒促進剤などとして有利に利用できる。

#### 実施例 8-9 注射剤

実施例2(2)の方法で得た酢酸 $\alpha$ -グルコシル- $\beta$ -アスコルビン酸粉末を水に溶解、中和し、常法に従って、精製濾過してバイロゲンフリーとし、この溶液を20mL等アンパルに $\alpha$ - $\beta$ -グルコシル- $\beta$ -アスコルビン酸513mgになるように分注し、これを封入して注射剤を製造した。

本注射剤は、単体で、または、他のビタミン、ミネラルなどと混合して筋肉内又は静脈内に投与できる。また、本品は、低温貯蔵の必要もなく、安定な製剤である。

本品は、 $\beta$ -アスコルビン酸の場合と比較して、体内滞留時間が約5乃至10倍に延長され、徐々に加水分解を受け、 $\beta$ -アスコルビン酸を放出し、 $\beta$ -アスコルビン酸本来の生理効果を發揮する。

また、本品は、ビタミンCの補助としてだけでなく、加水分解され抗酸化剤として抗酸化作用、過酸化脂質の生成抑制などの効果を發揮し、ウイルス感染症、細菌性疾患、外傷性疾患、免疫疾患、アレルギー疾患、糖尿病、白内障、閉経性疾患、癌性腫瘍などの各種疾患の予防剤、治療剤に有利に利用できる。

#### 実施例 8-10 注射剤

塩化ナトリウム0.5重量部、塩化カリウム0.5重量部、塩化カルシウム0.2重量部

、乳酸ナトリウム0.1重量部、マルトース1.5重量部及び実施例A-8の方法で得た高純度2- $\alpha$ - $\beta$ -グルコシル- $\beta$ -アスコルビン酸粉末1重量部を水1,400重量部に溶解し、常法に従って、精製濾過してバイロゲンフリーとし、この溶液を滅菌したプラスチック容器に55mLずつ充填して注射剤を製造した。

本品は、ビタミンCの補助としてだけでなく、カロリー補給、ミネラル供給剤としても利用され、更には、脱水分解され、抗酸化剤として冠性疾患の除去、過酸化脂質の生成抑制などの効果を發揮し、病中、病後の栄養療法、同歩療法、更には、ウイルス性疾患、細菌性疾患、外傷性疾患、免疫疾患、アレルギー疾患、糖尿病、白内障、閉経性疾患、癌性腫瘍などの各種疾患の予防剤、治療剤に有利に利用できる。

#### 実施例 8-11 経栄養剤

結晶性 $\alpha$ -マルトース20重量部、グリシン1.1重量部、グルタミン酸ナトリウム0.18重量部、食塩1.2重量部、クエン酸1重量部、乳酸カルシウム0.4重量部、炭酸マグネシウム0.1重量部、実施例A-5の方法で得た $\alpha$ -グルコシル- $\beta$ -アスコルビン酸含有粉末0.1重量部、ザンシン0.01重量部及びリボフラビン0.01重量部からなる混合物を調製する。

この配合物を24gずつをミキサーと製小瓶に充填し、ヒートシールして無菌製剤を調製した。

本経栄養剤は、一錠を約100乃至150mLの水に溶解し、経管投与により鼻経、胃、腸などへの経口的又は経腸口的栄養供給剤として有利に利用できる。

#### 実施例 8-12 錠剤

DL-乳酸ナトリウム21重量部、ピルビン酸ナトリウム8重量部、実施例A-1の方法で得た $\alpha$ -グルコシル- $\beta$ -アスコルビン酸含有粉末5重量部及びエタノール48重量部、清潤水28重量部及び着色料、香料の適量と混合し、常用法を製造した。

本品は、美肌剤、色白剤として好適であり、入浴用の湯に106乃至10,000倍に希釈して利用すればよい。本品は、入浴用の湯の場合と同様に、洗顔用水、化粧水などに希釈して利用することも有利に実施できる。

#### 実施例 8-13 乳膏

ポリオキシエチレンベヘニルエーテル0.5重量部、テトラオイン酸ポリオキ

シエチレンソルビトール1重量部、潤滑型モノステアリン酸グリセリン1重量部、ピルビン酸0.5重量部、ベヘニルアルコール0.5重量部、アザダナ油1重量部、実施例A-3の方法で得た高純度2- $\alpha$ - $\beta$ -グルコシル- $\beta$ -アスコルビン酸粉末1重量部、ビタミンE及び防腐剤の適量を、常法に従って加熱溶解し、これにDL-乳酸ナトリウム1重量部、1,3-ブチレンジグリコール5重量部、カルキエシピニルポリマー0.1重量部及び清潤水85.5重量部を加え、ホモゲナイザーにかけ乳化し、更に香料の適量を加えて最終配合し乳膏を製造した。

本品は、日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして有利に利用できる。

#### 実施例 8-14 クリーム

モノステアリン酸ポリオキシエチレンジグリコール2重量部、自己乳化型モノステアリン酸グリセリン5重量部、実施例A-8の方法で得た高純度2- $\alpha$ - $\beta$ -グルコシル- $\beta$ -アスコルビン酸粉末2重量部、流動パラフィン1重量部、トリオクタン酸グリセリル11重量部及び防腐剤の適量を、常法に従って加熱溶解し、これにDL-乳酸2重量部、1,3-ブチレンジグリコール5重量部及び清潤水85重量部を加え、ホモゲナイザーにかけ乳化し、更に香料の適量を加えて最終配合しクリームを製造した。

本品は、日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして有利に利用できる。

#### 【発明の意義】

本文で述べたごとく、本発明の新製物質 $\alpha$ -グルコシル- $\beta$ -アスコルビン酸は、高純度性を示す、安定性に優れ、しかも、生体内で容易に加水分解され、 $\beta$ -アスコルビン酸本来の抗酸化性、生理活性を發揮する。その上、 $\alpha$ -グルコシル- $\beta$ -アスコルビン酸は、生体内で生成され、代謝される物質でもあることが判明したことより、その安全性も極めて高い物質である。

また、 $\alpha$ -グルコシル- $\beta$ -アスコルビン酸が $\beta$ -アスコルビン酸と $\alpha$ -グルコシル糖化合物とを含有する系に糖転移酵素を作用させる生化学的手法により容易に生成できることより、製造性に優れ、その工業的価値も著高である。

更に、この直接還元性を示さない $\alpha$ -グルコシル- $\beta$ -アスコルビン酸は、安定性、生理活性も充分で、ビタミンCの強化剤としてばかりでなく、安定剤、品質改良剤、抗酸化剤、生理活性剤、紫外線吸収剤などとして、飲料、加工食品、嗜好物などの食品後、感受性疾患の予防剤、治療剤、更には美肌剤、色白剤な

ど化粧品など各種製剤に含有せしめて有利に利用できる。従って、本発明の $\alpha$ -グルコシル- $\beta$ -アスコルビン酸は広範な用途を有し、これら産業界に与える経済的意義は極めて大きい。

#### 4. 図面の詳細な説明

図は、本発明の $\alpha$ - $\beta$ -グルコシル- $\beta$ -アスコルビン酸の紫外線吸収スペクトル図を示す。

特許出願人

株式会社林原生物化学研究所

代表者 林 原 隆

(印1名)